



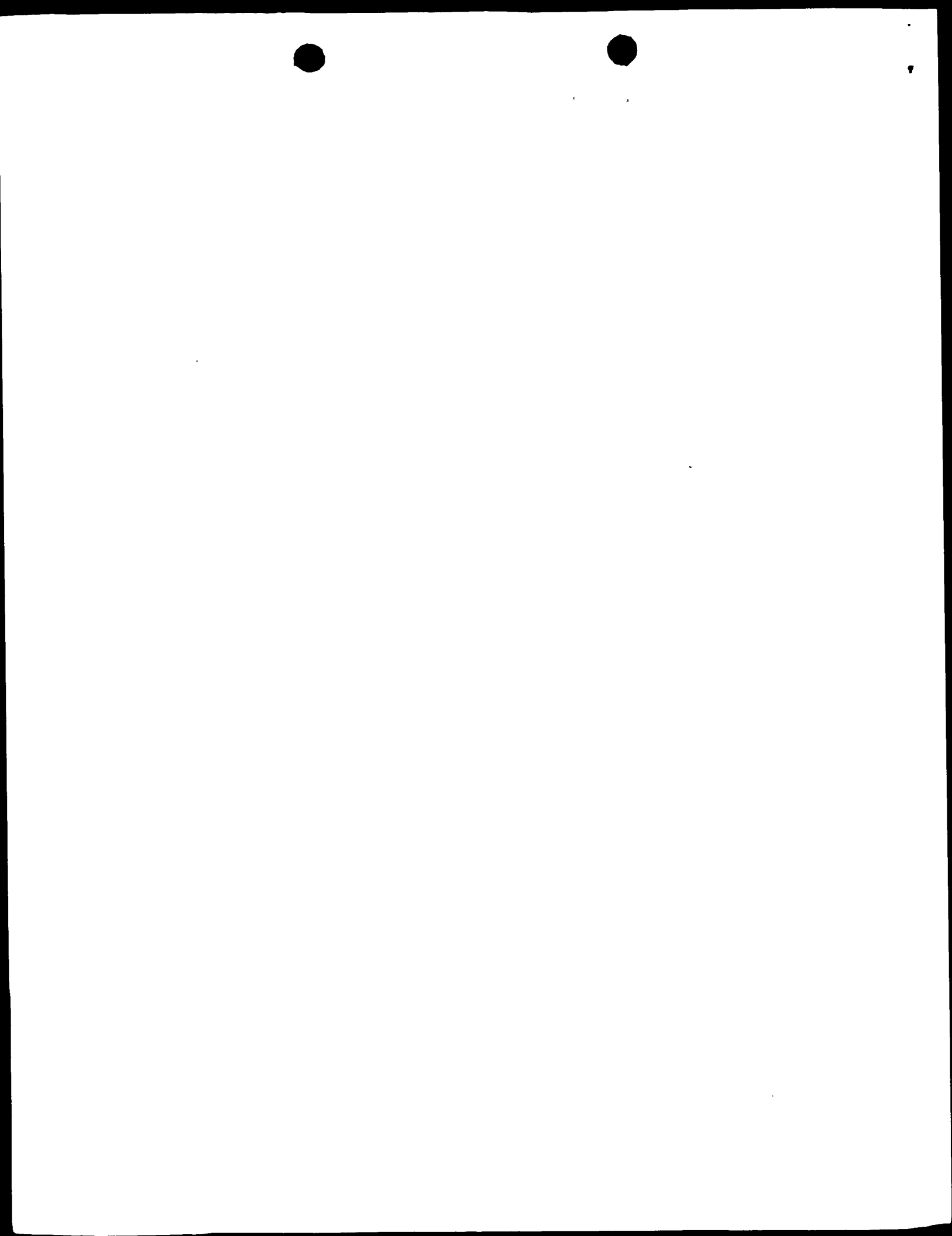
European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 99 91 8274

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|---|--|--|--|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6) |
| D,A | HIGUCHI, K., ET AL.: "Absence of nicotianamine synthase activity in the tomato mutant chloronerva" JOURNAL OF PLANT NUTRITION, vol. 19, no. 8-9, 1996, pages 1235-1239, XP000866559 * the whole document * | | |
| P,X | MORI ET AL: "Hordeum vulgare hvnas1 mRNA for nicotianamine synthase 1, complete cds" EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE,XX,XX, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002169700 accession no. AB010086 | 1-3,8-10 | |
| P,X | MORI ET AL: "Hordeum vulgare hvnas2 mRNA for nicotianamine synthase 2, complete cds" EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE,XX,XX, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002169701 accession no. AB011265 | 1-3,8-10 | |
| P,X | MORI ET AL: "Hordeum vulgare hvnas3 mRNA for nicotianamine synthase 3, complete cds" EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE,XX,XX, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002169702 accession no. AB011264 | 1-3,8-10 | TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6) |
| P,X | MORI ET AL: "Hordeum vulgare hvnas4 mRNA for nicotianamine synthase 4, complete cds" EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE,XX,XX, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002169703 accession no. AB011266 -/-- | 1-3,8-10 | |
| The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search. | | | |
| Place of search THE HAGUE | | Date of completion of the search 14 June 2001 | Examiner Holtorf, S |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document | | | |

1
EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)





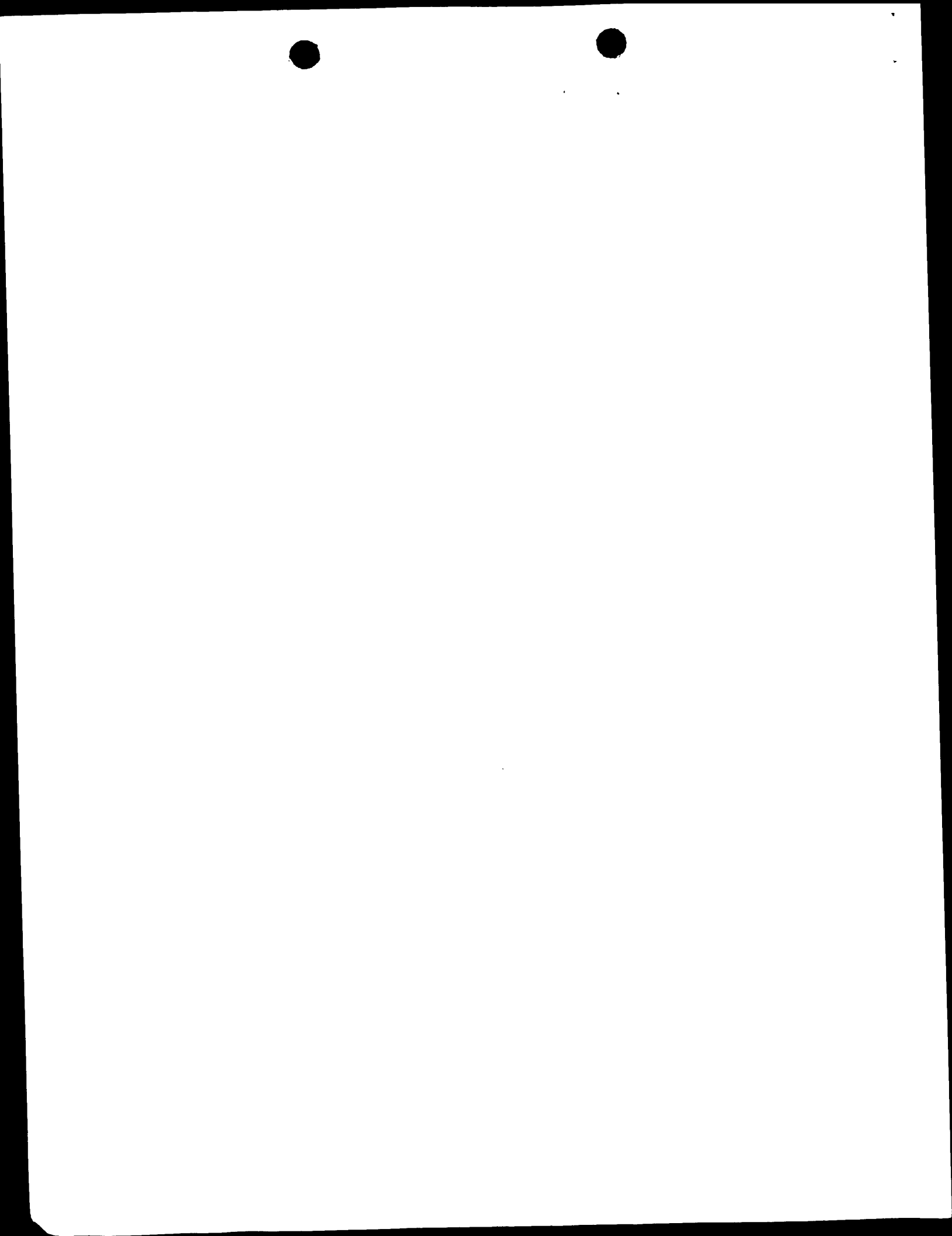
European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 99 91 8274

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|--|--|---|--|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6) |
| P,X | MORI ET AL: "Hordeum vulgare hvnas5 mRNA for nicotianamine synthase 5, complete cds" EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE,XX,XX, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002169704 accession no. AB011268 ---- | 1-3,8-10 | |
| P,X | MORI ET AL: "Hordeum vulgare hvnas6 mRNA for nicotianamine synthase 6, complete cds" EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE,XX,XX, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002127293 accession no. AB011269 ---- | 1-3,8-10 | |
| P,X | MORI ET AL: "Hordeum vulgare hvnas7 mRNA for nicotianamine synthase 7, complete cds" EMBL NUCLEOTIDE SEQUENCE,XX,XX, 5 February 1999 (1999-02-05), XP002169705 accession no. AB019525 ---- | 1-3,8-10 | |
| P,X | HIGUCHI ET AL: "Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores" PLANT PHYSIOLOGY,AMERICAN SOCIETY OF PLANT PHYSIOLOGISTS, ROCKVILLE, MD,US, vol. 119, February 1999 (1999-02), pages 471-479, XP002127294 ISSN: 0032-0889 ---- | 1-3,8-10 | TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6) |
| P,X | DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'Online! 5 February 1999 (1999-02-05) SUZUKI, K. AND MORI, S.: "Nicotianamine synthase from Arabidopsis thaliana" XP002169706 accession no. AB021935 ----- -/-- | 4,5,8,9, 11 | |
| The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search. | | | |
| Place of search THE HAGUE | | Date of completion of the search 14 June 2001 | Examiner Holtorf, S |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document | | | |

EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)





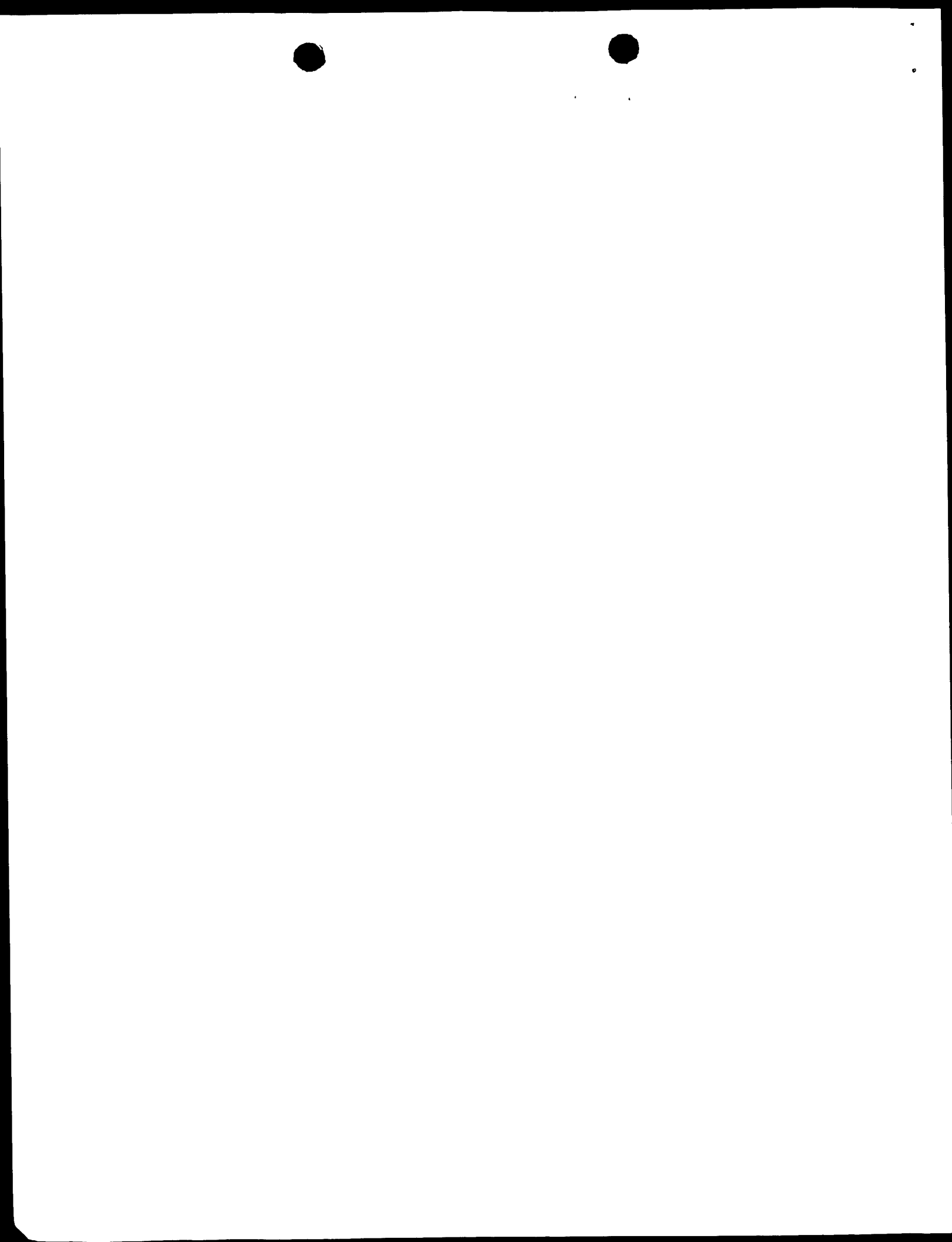
European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 99 91 8274

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|---|---|---|--|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6) |
| P,X | DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'Online! 5 February 1999 (1999-02-05) SUZUKI, K AND MORI, S.: "Nicotianamine synthase from Arabidopsis thaliana" XP002169707 / accession no. AB021934 | 4,5,8,9, 11 | |
| P,X | DATABASE EMBL DATABASE-TRANSLATED 'Online! 1 November 1998 (1998-11-01) VYSOTSKAIA, V.S., ET AL. : "Arabidopsis thaliana chromosome 1 BAC T12M4 sequence, complete sequence" XP002169708 / accession no. 080483 | 4,5,8,9, 11 | |
| P,X | DATABASE EMBL SEQUENCE LIBRARY 'Online! 5 February 1999 (1999-02-05) SUZUKI, K. AND MORI, S.: "Nicotianamine synthase from Arabidopsis thaliana" XP002169709 / accession no. AB021936 | 4,5,8,9, 11 | |
| E | WO 99 60107 A (INST PFLANZENGENETIK & KULTUR ;STEPHAN UDO (DE); GANAL MARTIN (DE)) 25 November 1999 (1999-11-25) * the whole document * | 1-3, 8-10, 12-21,25 | TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6) |
| The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search. | | | |
| Place of search THE HAGUE | | Date of completion of the search 14 June 2001 | Examiner Holtorf, S |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS | | | |
| X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document | | T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document | |

1
EPO FORM 1503 03 82 (P04C04)



EP 99 91 8274

14-06-2001

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|-------------------------------|--------------------------|
| WO 9960107 A | 25-11-1999 | DE 19824307 A AU 5150799 A | 25-11-1999 06-12-1999 |



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

55107

P0904511

J. A. KEMP & Co

REC'D 29 JUN 2001

Action by.....

Datum/Date

28.06.01

Zeichen/Ref./Réf.

N.80487TAC/AB

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°

99918274.4-2105-JP9902305

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

Japan Science and Technology Corporation

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

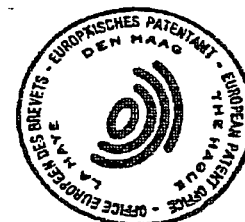
RECEIVED

JUL 01 2002

TECH CENTER 1800/2900

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.







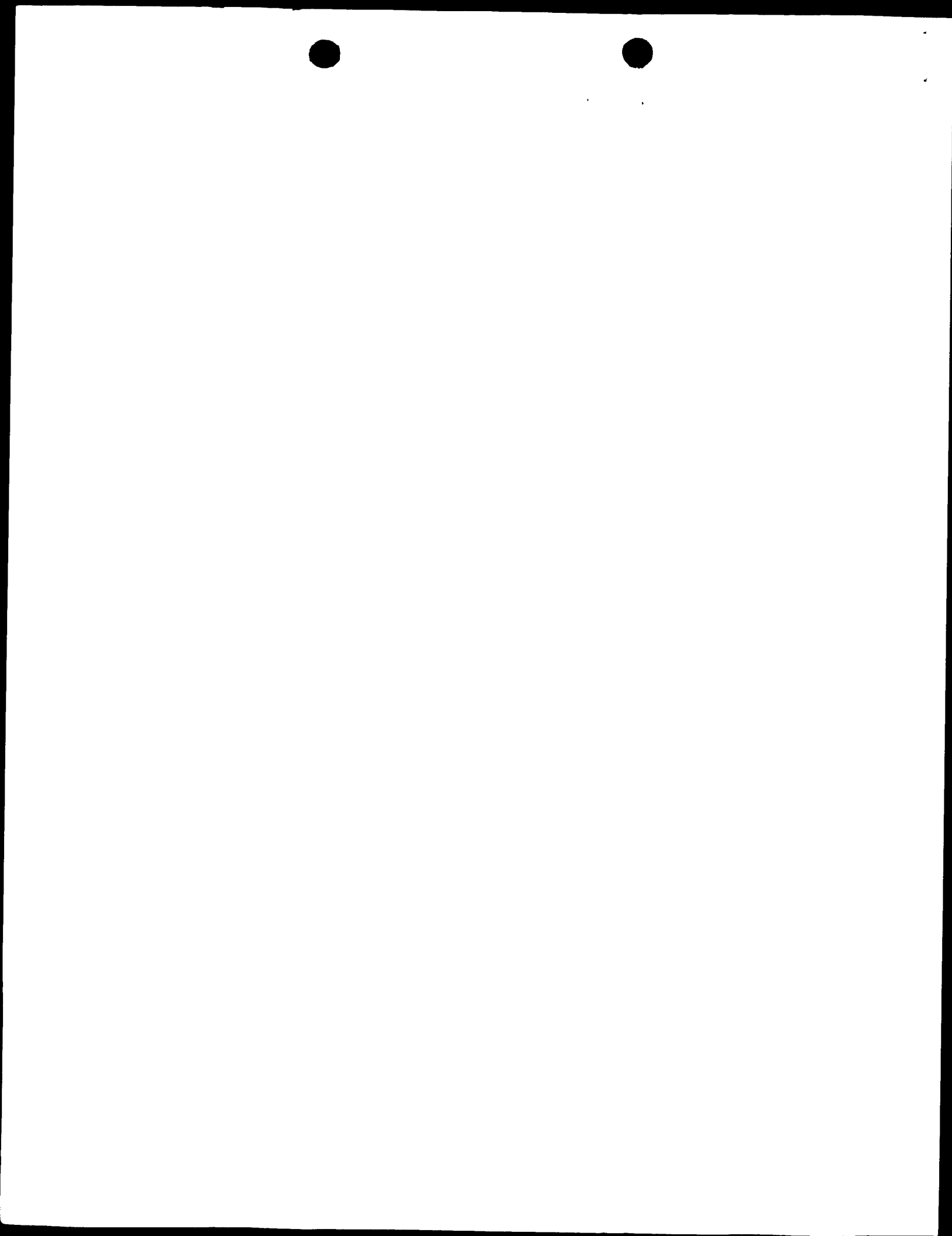
European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 99 91 8274

| DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | | |
|---|---|---|--|
| Category | Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages | Relevant to claim | CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6) |
| D,X | HIGUCHI, K., ET AL.: "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots" PLANT SOIL, vol. 165, 1994, pages 173-179, XP000866258 | 1-3, 8-10,25 | C12N15/54 C12N15/82 C12N9/10 C12N5/10 A01H5/00 |
| Y | * page 178, left-hand column, paragraph 4 * | 12-21 | |
| D,A | HIGUCHI, K., ET AL.: "The role of nicotianamine synthase in response to Fe nutrition status in Graminae" PLANT SOIL, vol. 178, 1996, pages 171-177, XP000866267 | 1-3, 8-10,25, 26 | |
| Y | * page 176, left-hand column, paragraph 4; table 1 * | 12-21 | |
| Y | S MORI: "Reevaluation of the genes induced by iron deficiency in barley roots" SOIL SCIENCE AND PLANT NUTRITION,JP,TOKYO, no. 43, 1997, page 975-980 XP002076369 ISSN: 0038-0768 * page 975, left-hand column, paragraph 1 * | 12-21 | |
| A | LING, H.-Q., ET AL.: "Genetic analysis of two tomato mutants affected in the regulation of iron metabolism" MOLECULAR AND GENERAL GENETICS, vol. 252, 1996, pages 87-92, XP002127297 * the whole document * | | |
| -/-- | | | |
| The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search. | | | |
| Place of search THE HAGUE | | Date of completion of the search 14 June 2001 | Examiner Holtorf, S |
| CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document | | | |

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C04)



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際調査機関）



出願人代理人

佐 伯 憲 生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル 9階

PCT

国際調査報告又は国際調査報告を作成しない旨
の決定の送付の通知書

（法施行規則第41条）
〔PCT規則44.1〕

発送日
（日・月・年）

10.08.99

出願人又は代理人
の書類記号

JA908462

今後の手続きについては、下記1及び4を参照。

国際出願番号

PCT/JP99/02305

国際出願日
（日・月・年）

30.04.99

出願人（氏名又は名称）

科学技術振興事業団

1. ☒ 国際調査報告が作成されたこと、及びこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

PCT19条の規定に基づく補正書及び説明書の提出

出願人は、国際出願の請求の範囲を補正することができる（PCT規則46参照）。

いつ 補正書の提出期間は、通常国際調査報告の送付の日から2月である。

詳細については添付用紙の備考を参照すること。

どこへ 直接次の場所へ

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

詳細な手続については、添付用紙の備考を参照すること。

2. ☐ 国際調査報告が作成されないこと、及び法第8条第2項（PCT17条(2)(a)）の規定による国際調査報告を作成しない旨の決定をこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

3. ☐ 法施行規則第44条（PCT規則40.2）に規定する追加手数料の納付に対する異議の申立てに関して、出願人に下記の点を通知する。

☐ 異議の申立てと当該異議についての決定を、その異議の申し立てと当該異議についての決定の両方を指定官庁へ送付することを求める出願人の請求とともに、国際事務局へ送付した。

☐ 当該異議についての決定は、まだ行われていない。決定されしだい出願人に通知する。

4. 今後の手続： 出願人は次の点に注意すること。

優先日から18月経過後、国際出願は国際事務局によりすみやかに国際公開される。出願人が公開の延期を望むときは、国際出願又は優先権の主張の取下げの通知がPCT規則90の2.1及び90の2.3にそれぞれ規定されているように、国際公開の事務的な準備が完了する前に国際事務局に到達しなければならない。

出願人が優先日から30月まで（官庁によってはもっと遅く）国内段階の開始を延期することを望むときは、優先日から19月以内に、国際予備審査の請求書が提出されなければならない。

国際予備審査の請求書若しくは、後にする選択により優先日から19箇月以内に選択しなかった又は第II章に拘束されないため選択できなかったすべての指定官庁に対しては優先日から20月以内に、国内段階の開始のための所定手続を取らなければならない。

名称及びあて名

日本国特許庁（ISA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

注 意

1. 国際調査報告の発送日から起算する条約第19条(1)及び規則46.1に従う国際事務局への補正期間に注意してください。
2. 条約22条(2)に規定する期間に注意してください。
3. 文献の写しの請求について
国際調査報告に記載した文献の複写
特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することもできますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許(実用新案・意匠)公報については、下記の点を明記してください。

- 特許・実用新案及び意匠の種類
- 出願公告又は出願公開の年次及び番号(又は特許番号、登録番号)
- 必要部数

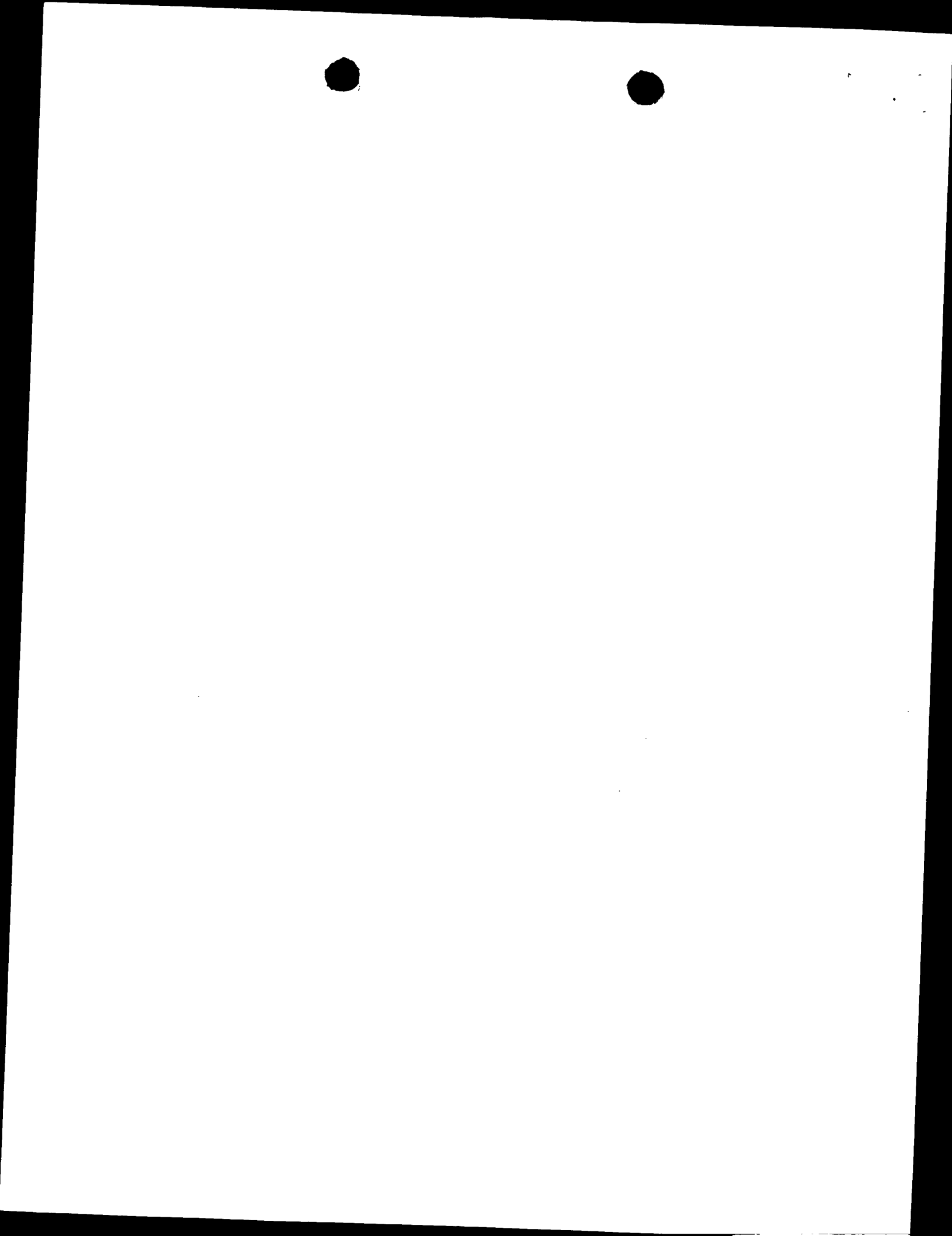
(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

- 国際調査報告の写しを添付してください(返却します)。

〔申込み及び照会先〕

〒135 東京都江東区東陽4-1-7 佐藤ダイヤビル
財団法人 日本特許情報機構 サービス課
TEL 03-5690-3900

注意 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。



様式PCT/ISA/220の備考

この備考は、PCT19条の規定に基づく補正書の提出に関する基本的な指示を与えるためのものである。この備考は特許協力条約並びにこの条約に基づく規則及び実施細則の規定に基づいている。この備考とそれらの規定とが相違する場合には、後者が適用される。詳細な情報については、WIPOの出版物であるPCT出願人の手引も参照すること。

PCT19条の規定に基づく補正書の提出に関する指示

出願人は、国際調査報告を受領した後、国際出願の請求の範囲を補正する機会が一回ある。しかし、国際出願のすべての部分（請求の範囲、明細書及び図面）が、国際予備審査の手続においても補正できるもので、例えば出願人が仮保護のために補正書を公開することを希望する場合又は国際公開前に請求の範囲を補正する別の理由がある場合を除き、通常PCT19条の規定に基づく補正書を提出する必要はないことを強調しておく。さらに、仮保護は一部の国のみで与えられるだけであることも強調しておく。

補正の対象となるもの

PCT19条の規定により請求の範囲のみ補正することができる。
国際段階においてPCT34条の規定に基づく国際予備審査の手続において請求の範囲を（更に）補正することができる。
明細書及び図面は、PCT34条の規定に基づく国際予備審査の手続においてのみ補正することができる。
国内段階に移行する際、PCT28条（又はPCT41条）の規定により、国際出願のすべての部分を補正することができる。

いつ

国際調査報告の送付の日から2月又は優先日から16月の内どちらか遅く満了するほうの期間内。しかし、その期間の満了後であっても国際公開の技術的な準備の完了前に国際事務局が補正を受領した場合には、その補正書は、期間内に受理されたものとみなすことを強調しておく（PCT規則46.1）。

補正書を提出すべきところ

補正書は、国際事務局のみに提出でき、受理官庁又は国際調査機関には提出してはいけない（PCT規則46.2）。国際予備審査の請求書を提出した/する場合については、以下を参照すること。

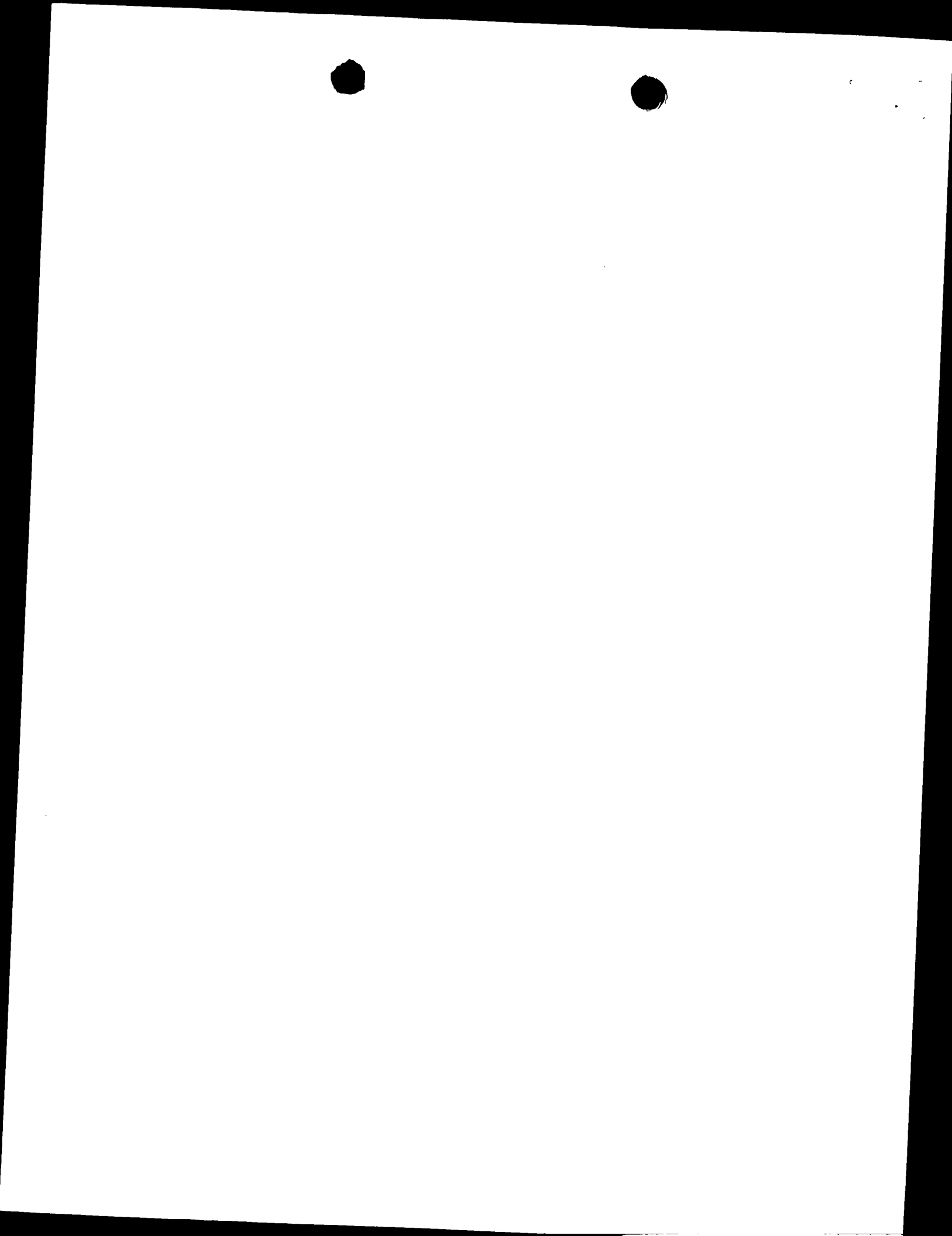
どのように

1以上の請求の範囲の削除、1以上の新たな請求の範囲の追加、又は1以上の請求の範囲の記載の補正による。
差替え用紙は、補正の結果、出願当初の用紙と相違する請求の範囲の各用紙毎に提出する。
差替え用紙に記載されているすべての請求の範囲には、アラビア数字を付さなければならない。請求の範囲を削除する場合、その他の請求の範囲の番号を付け直す必要はない。請求の範囲の番号を付け直す場合には、連続番号で付け直さなければならない（PCT実施細則第205号(b)）。
補正は国際公開の言語で行う。

補正書にどのような書類を添付しなければならないか

書簡（PCT実施細則第205号(b)）

補正書には書簡を添付しなければならない。
書簡は国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開されることはない。これを「PCT19条(1)に規定する説明書」と混同してはならない（「PCT19条(1)に規定する説明書」については、以下を参照）。
書簡は、英語又は仏語を選択しなければならない。ただし、国際出願の言語が英語の場合、書簡は英語で、仏語の場合、書簡は仏語で記載しなければならない。
書簡には、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違について表示しなければならない。特に、国際出願に記載した各請求の範囲との関連で次の表示（2以上の請求の範囲についての同一の表示する場合は、まとめることができる。）をしなければならない。
(i) この請求の範囲は変更しない。
(ii) この請求の範囲は削除する。
(iii) この請求の範囲は追加である。
(iv) この請求の範囲は出願時の1以上の請求の範囲と差し替える。
(v) この請求の範囲は出願時の請求の範囲の分割の結果である。



次に、添付する書簡中での、補正についての説明の例を示す。

1. [請求の範囲の一部の補正によって請求の範囲の項数が48から51になった場合] :
“請求の範囲1-29、31、32、34、35、37-48項は、同じ番号のもとに補正された請求の範囲と置き換えられた。請求の範囲30、33及び36項は変更なし。新たに請求の範囲49-51項が追加された。”
2. [請求の範囲の全部の補正によって請求の範囲の項数が15から11になった場合] :
“請求の範囲1-15項は、補正された請求の範囲1-11項に置き換えられた。”
3. [原請求の範囲の項数が14で、補正が一部の請求の範囲の削除と新たな請求の範囲の追加を含む場合] :
“請求の範囲1-6及び14項は変更なし。請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。”又は
“請求の範囲7-13は削除。新たに請求の範囲15、16及び17項を追加。その他の全ての請求の範囲は変更なし。”
4. [各種の補正がある場合] :
“請求の範囲1-10項は変更なし。請求の範囲11-13、18及び19項は削除。請求の範囲14、15及び16項は補正された請求の範囲14項に置き換えられた。請求の範囲17項は補正された請求の範囲15、16及び17項に分割された。新たに請求の範囲20及び21項が追加された。”

“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”(PCT規則46.4)

補正書には、補正並びにその補正が明細書及び図面に与える影響についての説明書を提出することができる(明細書及び図面はPCT19条(1)の規定に基づいては補正できない)。

説明書は、国際出願及び補正された請求の範囲とともに公開される。

説明書は、国際公開の言語で作成しなければならない。

説明書は、簡潔でなければならない、英語の場合又は英語に翻訳した場合に500語を越えてはならない。

説明書は、出願時の請求の範囲と補正された請求の範囲との相違を示す書簡と混同してはならない。説明書を、その書簡に代えることはできない。説明書は別紙で提出しなければならない、見出しを付すものとし、その見出しは“PCT19条(1)の規定に基づく説明書”の語句を用いることが望ましい。

説明書には、国際調査報告又は国際調査報告に列記された文献との関連性に関して、これらを誹謗する意見を記載してはならない。国際調査報告に列記された特定の請求の範囲に関連する文献についての言及は、当該請求の範囲の補正に関してのみ行うことができる。

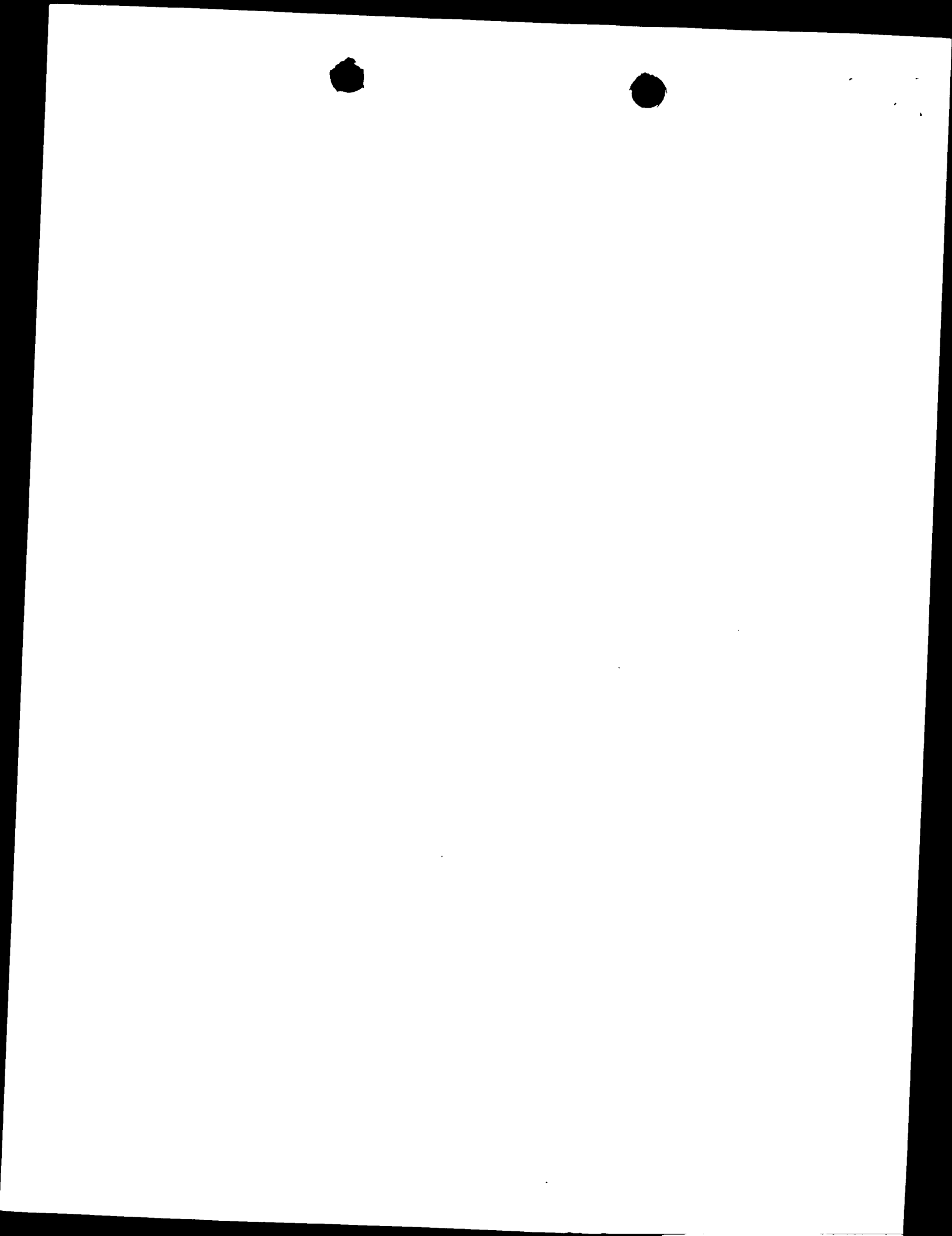
国際予備審査の請求書が提出されている場合

PCT19条の規定に基づく補正書及び添付する説明書の提出の時に国際予備審査の請求書が既に提出されている場合には、出願人は、補正書(及び説明書)を国際事務局に提出すると同時にその写し及び必要な場合、その翻訳文を国際予備審査機関にも提出することが望ましい(PCT規則55.3(a)、62.2の第1文を参照)。詳細は国際予備審査請求書(PCT/ISA/401)の注意書参照。

国内段階に移行するための国際出願の翻訳に関して

国内段階に移行する際、PCT19条の規定に基づいて補正された請求の範囲の翻訳を出願時の請求の範囲の翻訳の代わりに又は追加して、指定官庁/選択官庁に提出しなければならないこともあるので、出願人は注意されたい。

指定官庁/選択官庁の詳細な要求については、PCT出願人の手引きの第II巻を参照。



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]



| | | |
|----------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 JA908462 | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP99/02305 | 国際出願日 (日.月.年) 30.04.99 | 優先日 (日.月.年) 30.04.98 |
| 出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は

☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

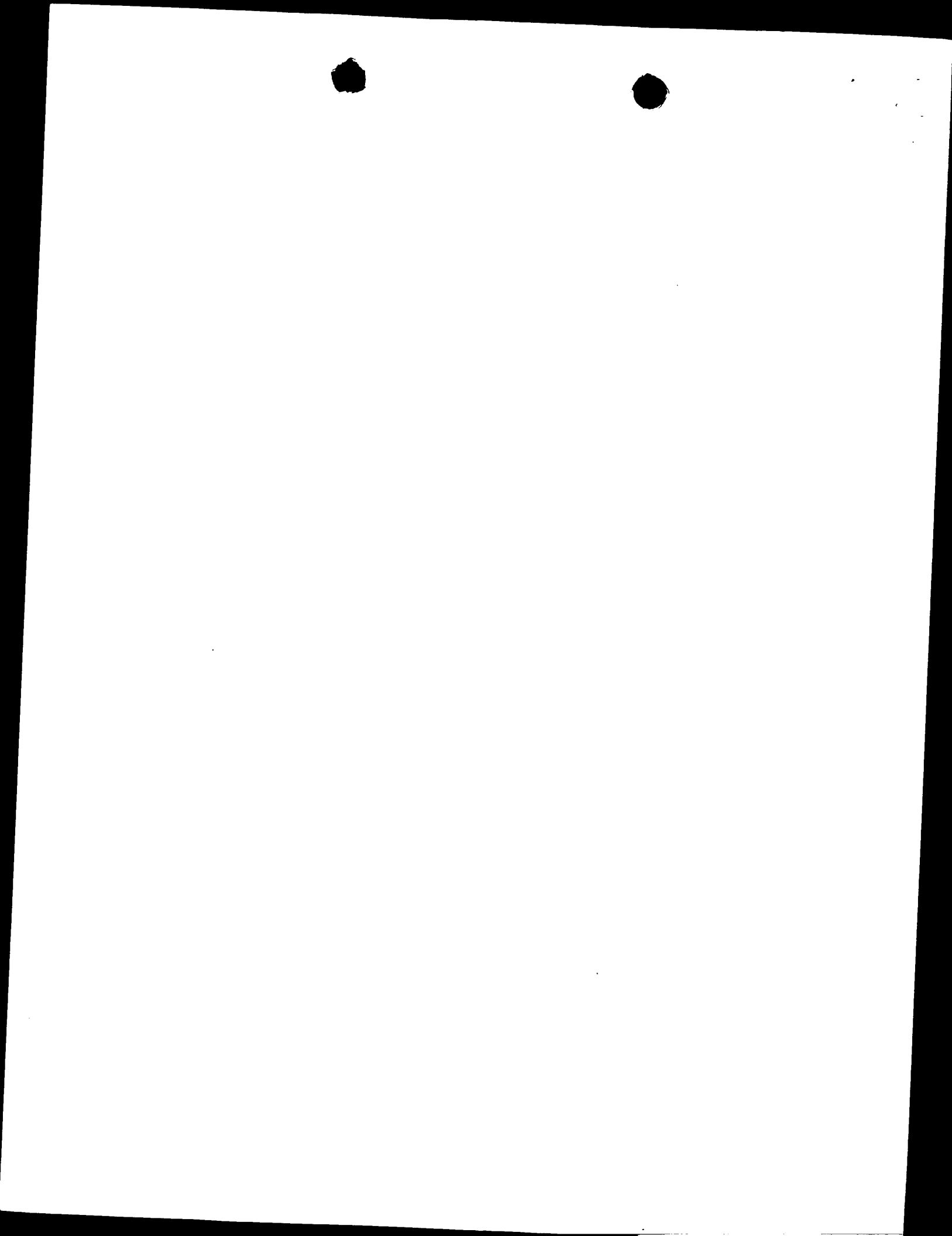
6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N9/00, 15/52, C12P13/04, C07K16/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N9/00-9/94, 15/52-15/61, C12P13/04, C07K16/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS, WPI

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|----------------------------|
| X A | Plant and Soil, Volume 165, Number 2, issued 1994, Kyoko Higuchi et al., "Purification and characterization of nico- titanamine synthase from Fe-deficient barley roots", pages 173-179 | 1-3, 22-24 4-21, 25, 26 |
| P, X | Plant Physiology, Volume 119, Number 2, issued February 1999, Kyoko Higuchi et al., "Cloning of Nicotianamine Syn- thase Genes, Novel Genes Involved in the Biosynthesis of Phytosiderophores", pages 471-479 | 1-26 |

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.99

国際調査報告の発送日 10.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生



4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------------|--|----------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB019525, February 11, 1999, Mori, S. and Higuchi, K., "Hordeum vulgare hvnas7 mRNA for nicotianamine synthase 7, complete cds." | 1-3, 8-10, 12-24 |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB021746, March 30, 1999, Mori, S., "Oryza sativa osnas1 mRNA for nicotianamine synthase 1, complete cds." | 1, 6-9, 12-24 |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB021934, February 11, 1999, Suzuki, K. and Mori, S., "Arabidopsis thaliana gene for nicotianamine synthase, complete cds." | 1, 4, 5, 8, 11-24 |

特許協力条約に基づく国際出願

願 書



出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。

| |
|---------------------------------|
| 受理官庁記入欄 |
| 国際出願番号 |
| 国際出願日 |
| (受付印) |
| 出願人又は代理人の書類記号 (希望する場合、最大12字) |

PCT
30.4.99
受領印

JA908462

第 I 欄 発明の名称

ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子

第 II 欄 出願人

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

科学技術振興事業団

Japan Science and Technology Corporation

〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-ken

332-0012 JAPAN

☐ この欄に記載した者は、
発明者でもある。

電話番号:

ファクシミリ番号:

加入電話番号:

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☒ 米国を除くすべての指定国

☐ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

第 III 欄 その他の出願人又は発明者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

森 敏 MORI Satoshi

〒275-0026 日本国千葉県習志野市谷津6-7-2-301

6-7-2-301, Yatsu, Narashino-shi, Chiba-ken,

275-0026 JAPAN

この欄に記載した者は
次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したとき
は、以下に記入しないこと)

国籍 (国名): 日本国 JAPAN

住所 (国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の
指定国についての出願人である:

☐ すべての指定国

☐ 米国を除くすべての指定国

☒ 米国のみ

☐ 追記欄に記載した指定国

☒ その他の出願人又は発明者が続業に記載されている。

第 IV 欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

次に記載された者は、国際機関において出願人のために行動する:

☒ 代理人

☐ 共通の代表者

氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

電話番号:

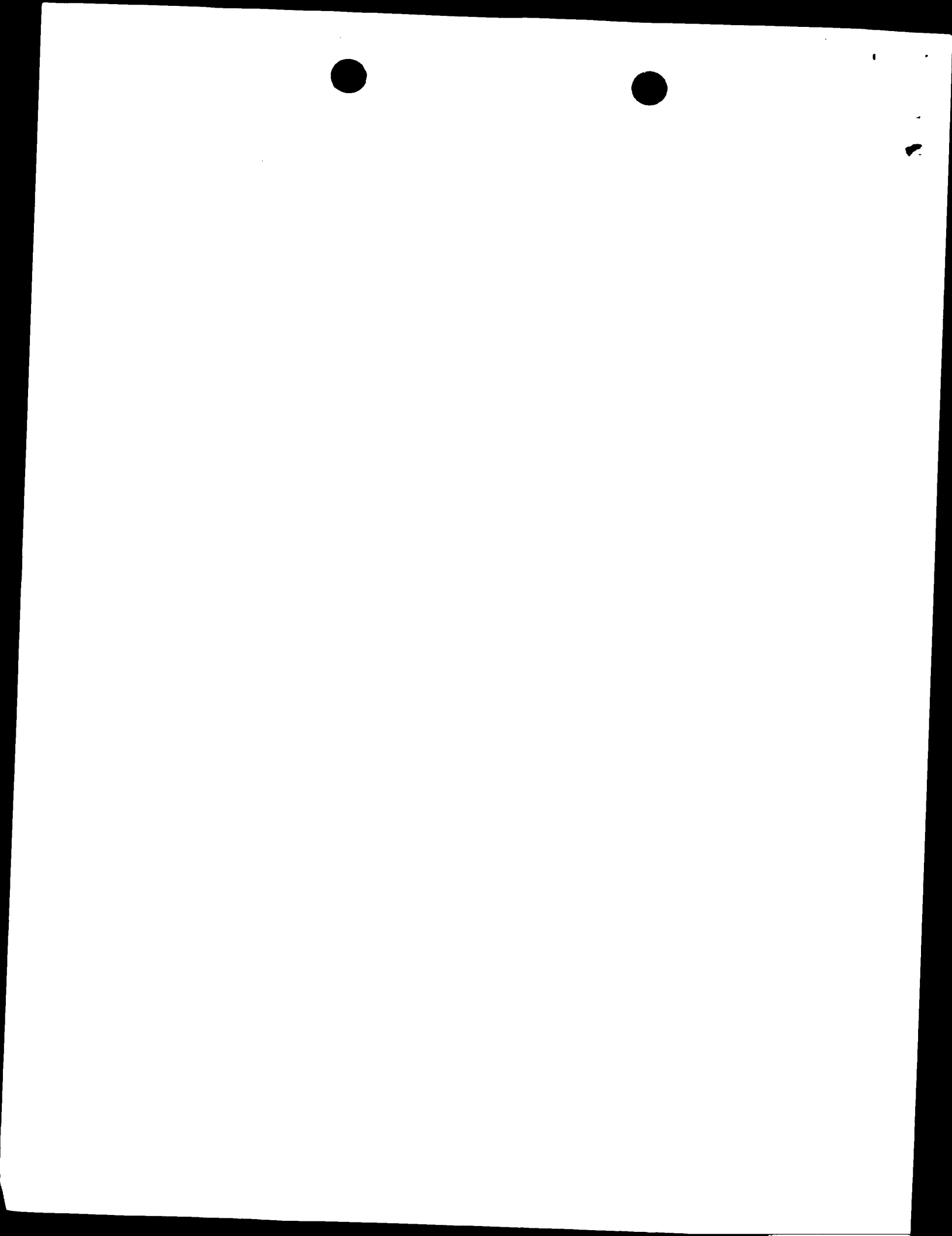
03-5205-2521

ファクシミリ番号:

03-5205-2522

加入電話番号:

☐ 通知のためのあて名: 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す



第III欄の続き その他の出願人又は発明者

この続表を使用しないときは、この用紙を願書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

樋口 恭子 HIGUCHI Kyoko

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生1-1-1
1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

鈴木 一矢 SUZUKI Kazuya

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生1-1-1
1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

西澤 直子 NISHIZAWA Naoko

〒113-0001 日本国東京都文京区白山1-37-9-705
1-37-9-705, Hakusan, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0001 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

氏名(名称)及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載)

中西 啓仁 NAKANISHI Hiromi

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生1-1-1
1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032 JAPAN

この欄に記載した者は、次に該当する:

☐ 出願人のみである。

☒ 出願人及び発明者である。

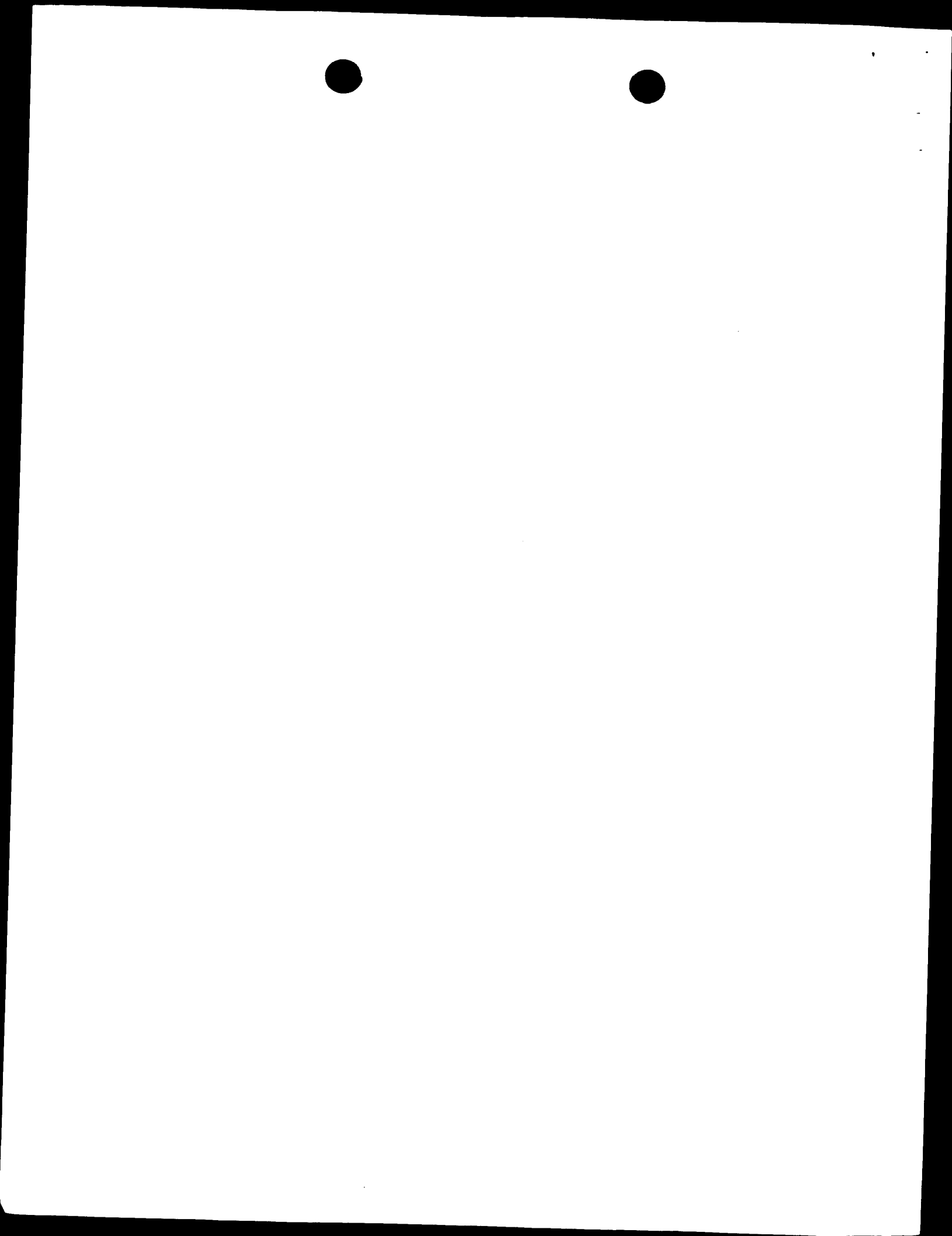
☐ 発明者のみである。
(ここにレ印を付したときは、以下に記入しないこと)

国籍(国名): 日本国 JAPAN

住所(国名): 日本国 JAPAN

この欄に記載した者は、次の指定国についての出願人である: ☐ すべての指定国 ☐ 米国を除くすべての指定国 ☒ 米国のみ ☐ 追記欄に記載した指定国

☐ その他の出願人又は発明者が他の続表に記載されている。



第Ⅴ欄 国の指定

規則 4.9(a)の規定に基づき次の指定を行う (該当する□にレ印を付すこと； 少なくとも1つの□にレ印を付すこと)。

以下に示す半符号

- ☐ AP ARIPO半符号：GI ガーナ Ghana, GM ガンビア Gambia, KE ケニア Kenya, LS レソト Lesotho, MW マラウイ Malawi, SD スーダン Sudan, SZ スワジランド Swaziland, UG ウガンダ Uganda, ZW ジンバブエ Zimbabwe, 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ EA ユーラシア半符号：AM アルメニア Armenia, AZ アゼルバイジャン Azerbaijan, BY ベラルーシ Belarus, KG キルギス Kyrgyzstan, KZ カザフスタン Kazakhstan, MD モルドヴァ Republic of Moldova, RU ロシア Russian Federation, TJ タジキスタン Tajikistan, TM トルクメニスタン Turkmenistan, 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☒ EP ヨーロッパ半符号：AT オーストリア Austria, BE ベルギー Belgium, CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein, CY キプロス Cyprus, DE ドイツ Germany, DK デンマーク Denmark, ES スペイン Spain, FI フィンランド Finland, FR フランス France, GB 英国 United Kingdom, GR ギリシャ Greece, IE アイルランド Ireland, IT イタリア Italy, LU ルクセンブルグ Luxembourg, MC モナコ Monaco, NL オランダ Netherlands, PT ポルトガル Portugal, SE スウェーデン Sweden, 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国
- ☐ OA OAPI半符号：BF ブルキナ・ファソ Burkina Faso, BJ ベナン Benin, CF 中央アフリカ Central African Republic, CG コンゴ Congo, CI コートジボアール Côte d'Ivoire, CM カメルーン Cameroon, GA ガボン Gabon, GN ギニア Guinea, ML マリ Mali, MR モーリタニア Mauritania, NE ニジェール Niger, SN セネガル Senegal, TD チャード Chad, TG トーゴ Togo, 及びアフリカ知的所有権機構のメンバー国と特許協力条約の締約国である他の国 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

国内半符号 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には点線の上に記載する)

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL アルバニア Albania | <input type="checkbox"/> LT リトアニア Lithuania |
| <input type="checkbox"/> AM アルメニア Armenia | <input type="checkbox"/> LU ルクセンブルグ Luxembourg |
| <input type="checkbox"/> AT オーストリア Austria | <input type="checkbox"/> LV ラトヴィア Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU オーストラリア Australia | <input type="checkbox"/> MD モルドヴァ Republic of Moldova |
| <input type="checkbox"/> AZ アゼルバイジャン Azerbaijan | <input type="checkbox"/> MG マダガスカル Madagascar |
| <input type="checkbox"/> BA ボスニア・ヘルツェゴヴィナ Bosnia and Herzegovina | <input type="checkbox"/> MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input type="checkbox"/> BB バルバドス Barbados | <input type="checkbox"/> MN モンゴル Mongolia |
| <input type="checkbox"/> BG ブルガリア Bulgaria | <input type="checkbox"/> MW マラウイ Malawi |
| <input type="checkbox"/> BR ブラジル Brazil | <input type="checkbox"/> MX メキシコ Mexico |
| <input type="checkbox"/> BY ベラルーシ Belarus | <input type="checkbox"/> NO ノールウェー Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA カナダ Canada | <input type="checkbox"/> NZ ニュー・ジーランド New Zealand |
| <input type="checkbox"/> CH and LI スイス及びリヒテンシュタイン Switzerland and Liechtenstein | <input type="checkbox"/> PL ポーランド Poland |
| <input type="checkbox"/> CN 中国 China | <input type="checkbox"/> PT ポルトガル Portugal |
| <input type="checkbox"/> CU キューバ Cuba | <input type="checkbox"/> RO ルーマニア Romania |
| <input type="checkbox"/> CZ チェッコ Czech Republic | <input type="checkbox"/> RU ロシア Russian Federation |
| <input type="checkbox"/> DE ドイツ Germany | <input type="checkbox"/> SD スーダン Sudan |
| <input type="checkbox"/> DK デンマーク Denmark | <input type="checkbox"/> SE スウェーデン Sweden |
| <input type="checkbox"/> EE エストニア Estonia | <input type="checkbox"/> SG シンガポール Singapore |
| <input type="checkbox"/> ES スペイン Spain | <input type="checkbox"/> SI スロヴェニア Slovenia |
| <input type="checkbox"/> FI フィンランド Finland | <input type="checkbox"/> SK スロヴァキア Slovakia |
| <input type="checkbox"/> GB 英国 United Kingdom | <input type="checkbox"/> SL シェラ・レオネ Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GE グルジア Georgia | <input type="checkbox"/> TJ タジキスタン Tajikistan |
| <input type="checkbox"/> GH ガーナ Ghana | <input type="checkbox"/> TM トルクメニスタン Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GM ガンビア Gambia | <input type="checkbox"/> TR トルコ Turkey |
| <input type="checkbox"/> GW ギニア・ビサオ Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TT トリニダード・トバゴ Trinidad and Tobago |
| <input type="checkbox"/> HR クロアチア Croatia | <input type="checkbox"/> UA ウクライナ Ukraine |
| <input type="checkbox"/> HU ハンガリー Hungary | <input type="checkbox"/> UG ウガンダ Uganda |
| <input type="checkbox"/> ID インドネシア Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> US 米国 United States of America |
| <input type="checkbox"/> IL イスラエル Israel | <input type="checkbox"/> UZ ウズベキスタン Uzbekistan |
| <input type="checkbox"/> IS アイスランド Iceland | <input type="checkbox"/> VN ヴィエトナム Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP 日本 Japan | <input type="checkbox"/> YU ユーゴスラヴィア Yugoslavia |
| <input type="checkbox"/> KE ケニア Kenya | <input type="checkbox"/> ZW ジンバブエ Zimbabwe |
| <input type="checkbox"/> KG キルギス Kyrgyzstan | |
| <input type="checkbox"/> KR 韓国 Republic of Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ カザフスタン Kazakhstan | |
| <input type="checkbox"/> LC セント・ルシア Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK スリ・ランカ Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR リベリア Liberia | |
| <input type="checkbox"/> LS レソト Lesotho | |

以下の□は、この様式の施行後に特許協力条約の締約国となった国を指定 (国内特許のために) するためのものである

- ☐ _____
- ☐ _____
- ☐ _____
- ☐ _____
- ☐ _____

確認の指定の宣言：出願人は、上記の指定に加えて、規則 4.9(b)の規定に基づき、特許協力条約の下で認められる他の全ての国の指定を行う。ただし、この宣言から除く旨の表示を追記欄にした国は、指定から除かれる。出願人は、これらの追加される指定が確認を条件としていること、並びに優先日から15月が経過する前にその確認がなされない指定は、この期間の経過時に、出願人によって取り下げられたものとみなされることを宣言する。(指定の確認は、指定を特定する通知の提出と指定手数料及び確認手数料の納付からなる。この確認は、優先日から15月以内に受理官庁へ提出しなければならない。)

| 第VI欄 優先権主張 | | <input type="checkbox"/> 他の優先権の主張（先の出願）が追記欄に記載されている | | |
|--------------------|----------------------|---|---------------|--------------|
| 先の出願日 (日. 月. 年) | 先の出願番号 | 先の出願 | | |
| | | 国内出願 : 国名 | 広域出願 : *広域官庁名 | 国際出願 : 受理官庁名 |
| (1) 30. 04. 98 | 平成10年特許願 第137685号 | 日本国 JAPAN | | |
| (2) | | | | |
| (3) | | | | |

☒ 上記()の番号の先の出願（ただし、本国際出願が提出される受理官庁に対して提出されたものに限る）のうち、次の()の番号のものについては、出願書類の認証謄本を作成し国際事務局へ送付することを、受理官庁（日本国特許庁の長官）に対して請求している。

(1)

*先の出願が、ARIPOの特許出願である場合には、その先の出願を行った工業所有権の保護のためのパリ条約同盟国の少なくとも1ヶ国を追記欄に表示しなければならない（規則4.10(b)(ii)）。追記欄を参照。

第VII欄 国際調査機関

| | | | |
|----------------|--|------|------------|
| 国際調査機関（ISA）の選択 | 先の調査結果の利用請求；当該調査の照会（先の調査が、国際調査機関によって既に実施又は請求されている場合） | | |
| ISA / JP | 出願日 (日. 月. 年) | 出願番号 | 国名（又は広域官庁） |

第VIII欄 照合欄：出願の言語

この国際出願の用紙の枚数は次のとおりである。

| | |
|-------------|------|
| 願書 | 4 枚 |
| 明細書（配列表を除く） | 23 枚 |
| 請求の範囲 | 2 枚 |
| 要約書 | 1 枚 |
| 図面 | 18 枚 |
| 明細書の配列表 | 34 枚 |
| 合計 | 82 枚 |

この国際出願には、以下にチェックした書類が添付されている。

- | | |
|---|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 5. <input type="checkbox"/> 優先権書類（上記第VI欄の()の番号を記載する） |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面 | 6. <input type="checkbox"/> 国際出願の翻訳文（翻訳に使用した言語名を記載する） |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込みを証明する書面 | 7. <input type="checkbox"/> 寄託した微生物又は他の生物材料に関する書面 |
| 2. <input checked="" type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 8. <input checked="" type="checkbox"/> スクレオチド又はアミノ酸配列表（フレキシブルディスク） |
| 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し | 9. <input checked="" type="checkbox"/> その他（書類名を詳細に記載する） |
| 4. <input type="checkbox"/> 記名押印（署名）の説明書 | |
- ・陳述書
・優先権書類送付請求書
・フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面

要約書とともに提示する図面：

本国際出願の使用言語名： 日本語

第IX欄 提出者の記名押印

各人の氏名（名称）を記載し、その次に押印する。

佐伯憲生



| | | |
|---|----------|---|
| 1. 国際出願として提出された書類の実際の受理の日 | | 2. 図面 <input type="checkbox"/> 受理された <input type="checkbox"/> 不足図面がある |
| 3. 国際出願として提出された書類を補充する書類又は図面であつて その後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日） | | |
| 4. 特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日 | | |
| 5. 出願人により特定された 国際調査機関 | ISA / JP | |
| 6. <input type="checkbox"/> 調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない | | |

国際事務局記入欄

記録原本の受理の日

形式 PCT / PC / 101 (局紙用紙) (1000年7月)



P C T

手数料計算用紙
願書附属書

受理官庁記入欄

国際出願番号

受理官庁の日付印

出願人又は代理人の書類記号

J A 9 0 8 4 6 2

出願人

科学技術振興事業団

所定の手数料の計算

1. 及び 2. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第 18 条第 1 項第 1 号の規定による手数料（注 1）
（送付手数料【T】及び調査手数料【S】の合計）

95,000 円 T + S

3. 国際手数料（注 2）

基本手数料

国際出願に含まれる用紙の枚数 82 枚

最初の 30 枚まで

54,800 円 b 1

52 × 1,300 =

67,600 円 b 2

30 枚を超える用紙の枚数 用紙 1 枚の手数料

b 1 及び b 2 に記入した金額を加算し、合計額を B に記入

122,400 円 B

指定手数料

国際出願に含まれる指定数（注 3） 5

5 × 12,600 =

63,000 円 D

支払うべき指定手数料
の数（上限は 11）
（注 4）

1 指定当たりの手数料
（円）

B 及び D に記入した金額を加算し、合計額を I に記入

185,400 円 I

4. 納付すべき手数料の合計

T + S 及び I に記入した金額を加算し、合計額を合計に記入

280,400 円

合 計

（注 1）送付手数料及び調査手数料については、合計金額を特許印紙をもって納付しなければならない。

（注 2）国際手数料については、受理官庁である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。

（注 3）願書第 V 欄でレ印を付した口の数。

（注 4）指定数を記入する。ただし、11 指定以上は一律 11 とする。

ご利用明細

ご来店いただき
ありがとうございます。



東京三菱銀行

| | | |
|--|-------|-----------|
| 年月日 | 取扱店番 | お取引内容 |
| 110428 | 0022 | お振込 |
| 受付通番 | 銀行番号 | 支店番号 |
| 2553 | | |
| 時刻 | 税込手数料 | お取引金額 |
| 14.39 | ¥262★ | ¥185,400★ |
| お取扱いき ない場合 | 残高 | |
| お取扱金額 | 18 | 0 |
| ご案内 | 2770 | ¥338★ |
| お振込先は 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA様 ご依頼人は タクミツキョ サエキノリオ様 電話 0352052521 | | |



基本手数料

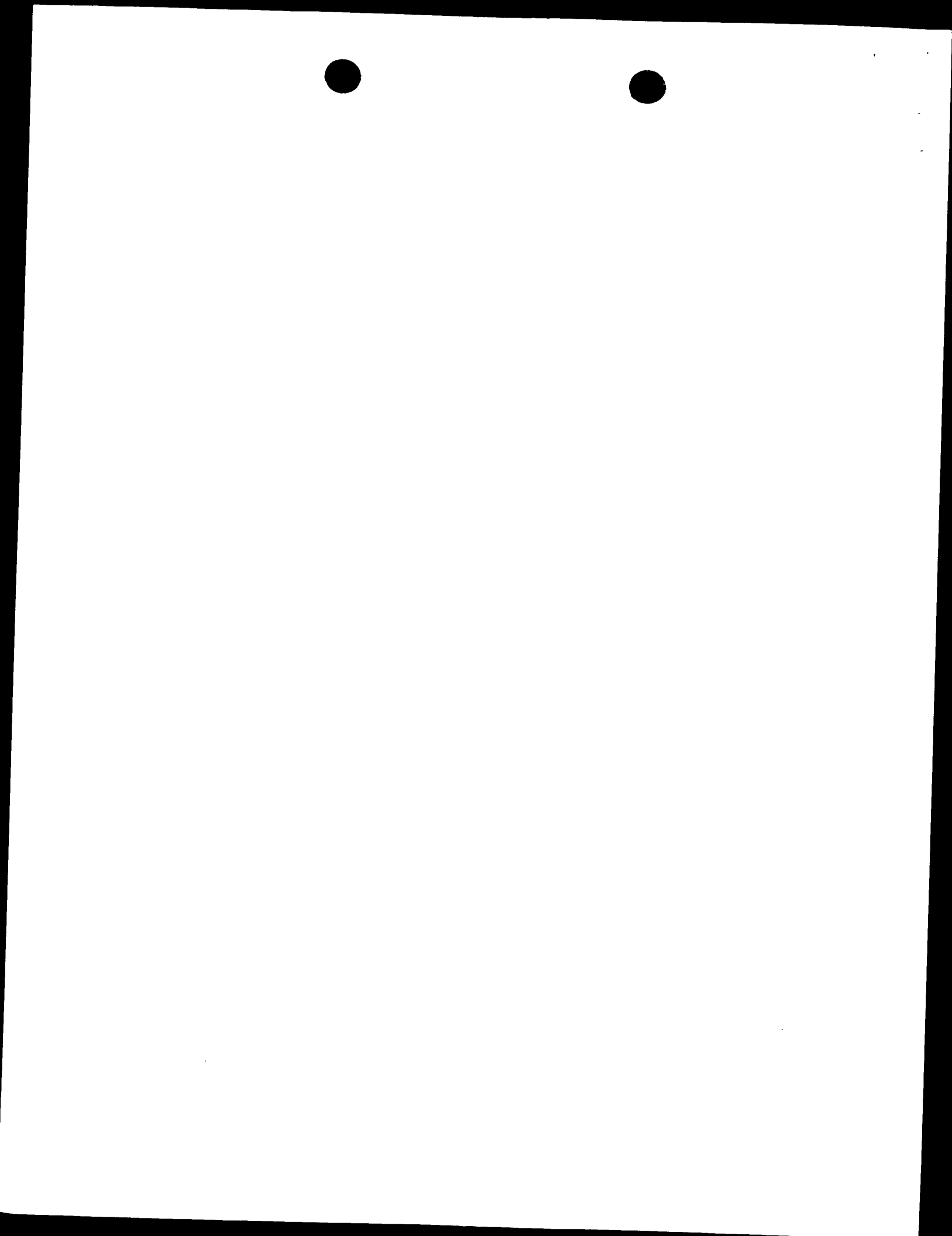
122,400円

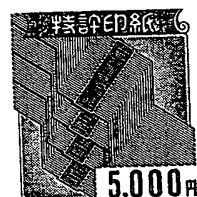
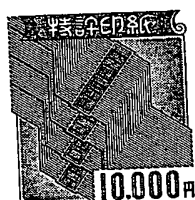
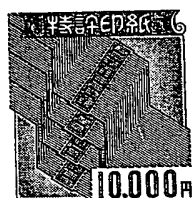
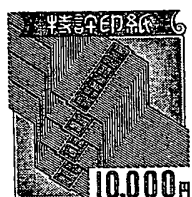
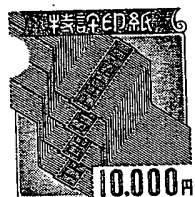
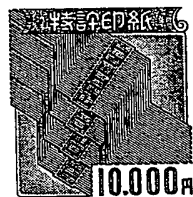
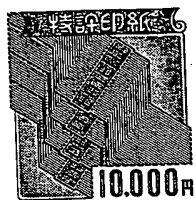
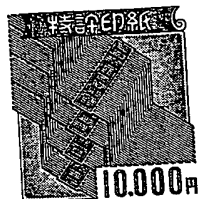
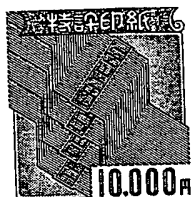
指定手数料

63,000円

合計

185,400円





送付手数料・調査手数料

95,000円

優先権書類送付請求書



特許庁長官 伊佐山 建志殿

1. 国際出願の表示 30.04.99 提出の国際出願
出願人又は代理人の書類記号 JA908462

2. 優先権の主張の基礎となる出願の表示

平成10年特許願第137685号

3. 出 願 人
名 称

科学技術振興事業団
Japan Science and Technology Corporation

あて名

〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-Ken
332-0012 JAPAN

国 籍

日本国 JAPAN

住 所

日本国 JAPAN

4. 代 理 人
氏 名

(10266) 弁理士 佐 伯 憲 生
SAEKI Norio

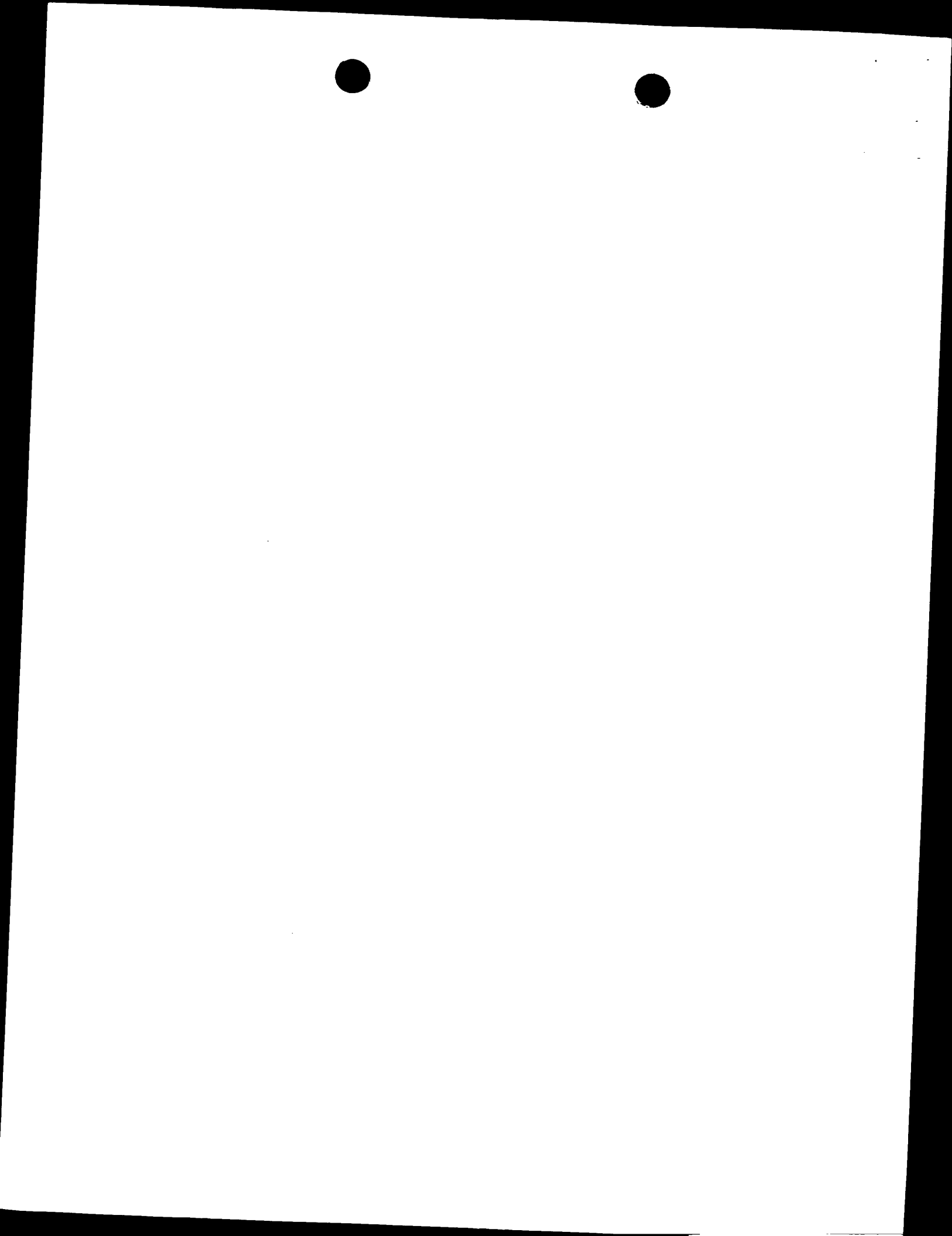


あて名

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目
15番2号 高愛ビル 9階
9th Floor, Taka-ai Bldg., 15-2, Nihonbashi 3-chome,
Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

5. 添付書類の目録

平成10年特許願第137685号



優先権証明願 (P C T)



特許庁長官 伊佐山 建志 殿

1. 出願番号 平成10年特許願第137685号

2. 請求人

識別番号 100102668

住所 〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目
15番2号
高愛ビル 9階

氏名 弁理士 佐伯憲生



電話番号 03(5205)2521

3. 出願国名 P C T



(1,500円)

陳述書

特許庁長官 伊佐山 健志殿



本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを陳述します。

平成11年04月30日

国際出願の表示 30.04.99 提出の国際出願
出願人又は代理人の書類番号 JA908462

発明の名称 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子


代理人

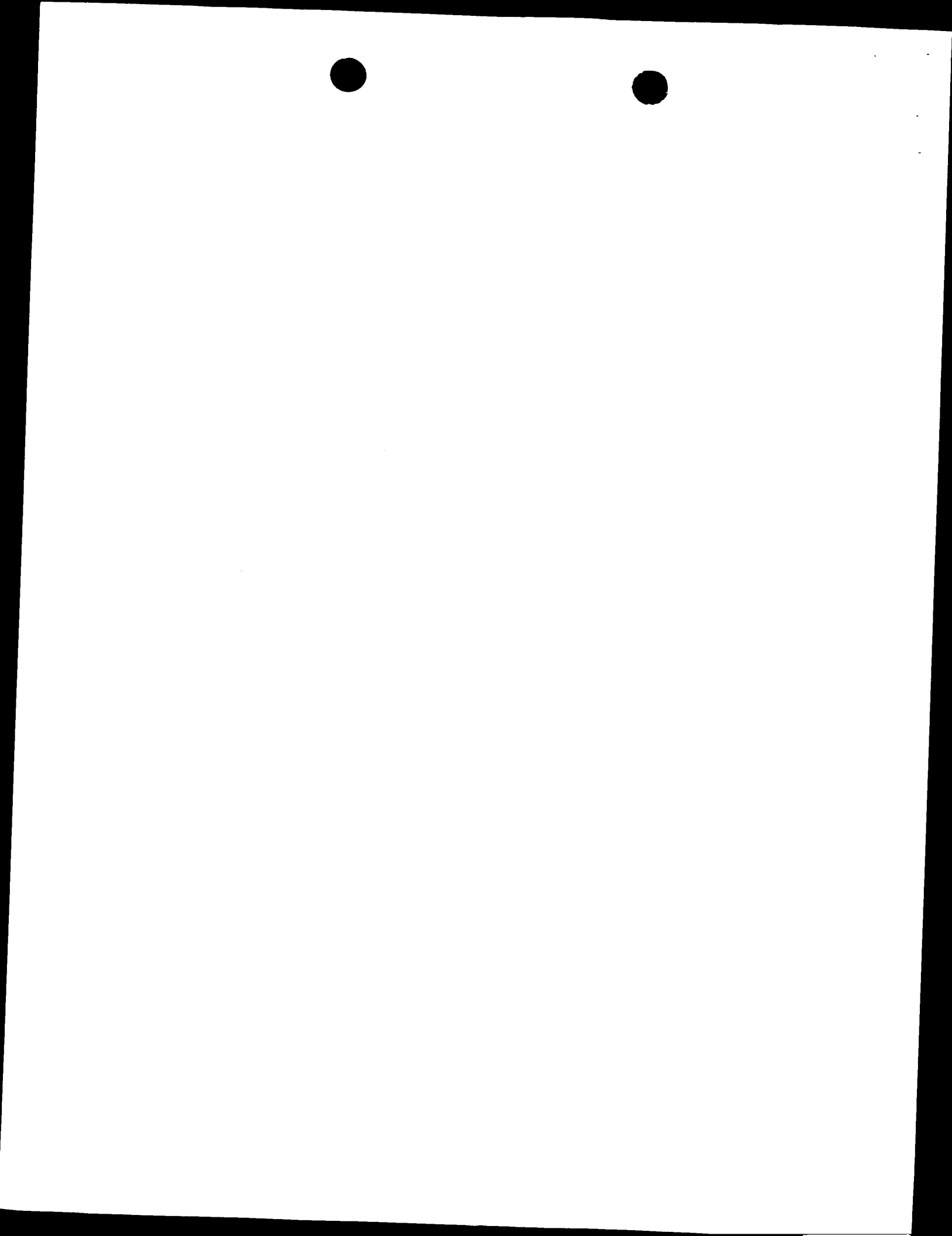
(10266) 弁理士 佐伯 憲生
SAEKI Norio



フレキシブルディスクの記録形式等の情報を記載した書面



1. 出願人名称 科学技術振興事業団
Japan Science and Technology Corporation
2. 代理人氏名 佐伯 憲生 SAEKI Norio 
3. 国際出願の表示 30.04.99 提出の国際出願
出願人又は代理人の書類番号 JA908462
4. 発明の名称 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子
5. 使用した文字列コード J I S コード
6. 配列を記載したファイル名
JA908462.TXT
7. 連絡先
 電話番号 03 (5205) 2521
 担当者氏名 佐伯 憲生



委任状

1998年 4月16日

私儀

弁理士 (10266) 佐伯憲生氏

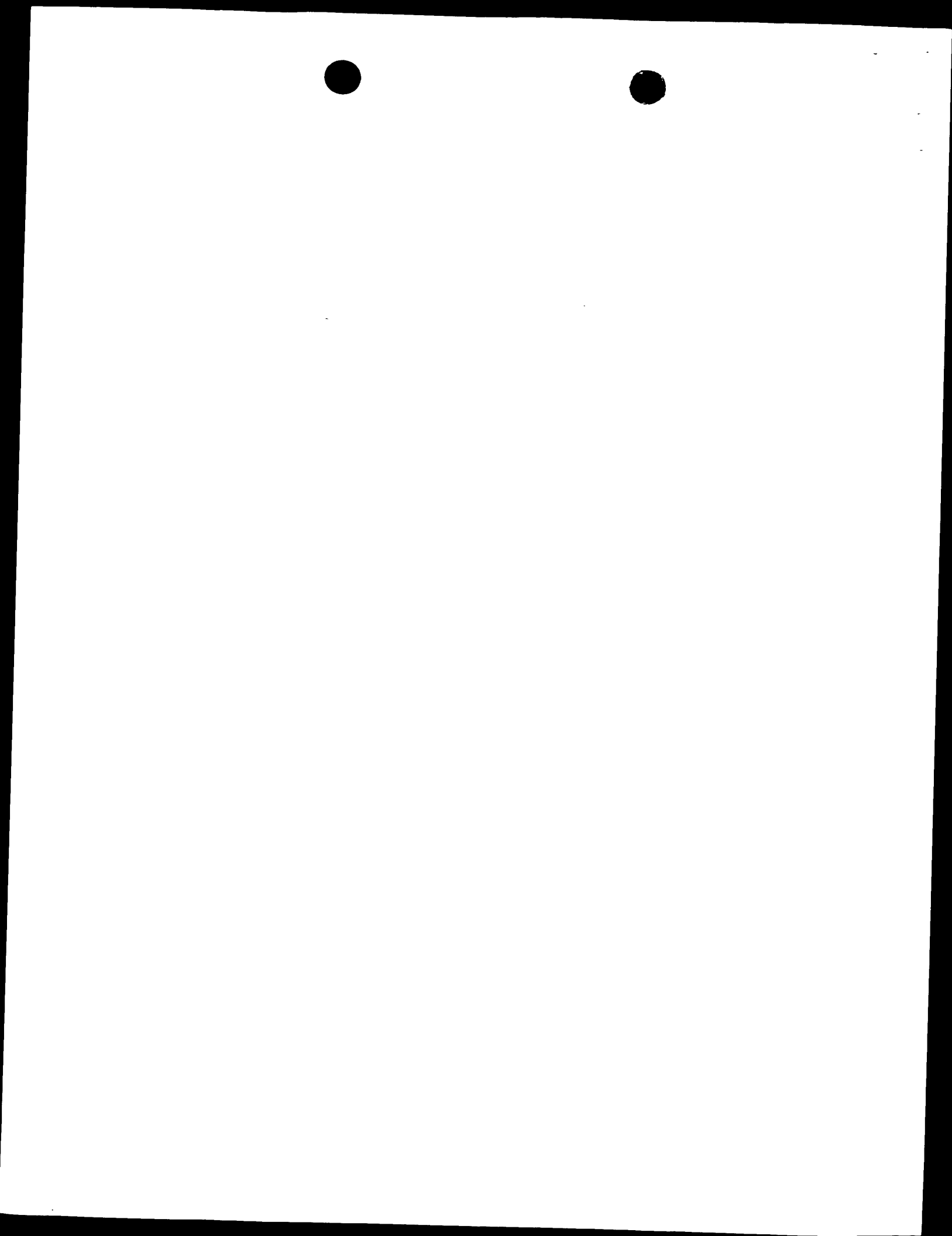
を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願
「ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子」
に関する一切の件
2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件
3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び
選択国の選択を取り下げる件

あて名 千葉県習志野市谷津 6-7-2-301

氏名 森 敏





委任状

1998年 4月 16日


私儀

弁理士 (10266) 佐伯憲生氏


を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願
「コチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子」
に関する一切の件
2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件
3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び
選択国の選択を取り下げる件


あて名 東京都文京区弥生 1-1-1

氏名 樋口 恭子 

あて名 東京都文京区弥生 1-1-1

氏名 鈴木 一矢 

あて名 東京都文京区白山 1-37-9-705

氏名 西澤 直子 



あて名 東京都文京区弥生 1-1-1

氏名 中西 啓仁



委任状

1998年4月16日

私儀

弁理士(10266)佐伯 憲生氏

を以て代理人と定め、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく国際出願

「ユチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子」
に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び
選択国の選択を取り下げる件

委 任 状

1999年 4月 15日

私儀 弁理士 佐伯 憲生氏を代理人と定めて、下記の権限を委任します。

1. 特許協力条約に基づく出願

「ニコチアミン合成酵素、それをコードする遺伝子」

に関する一切の件

2. 上記出願及び指定国の指定を取り下げる件

3. 上記出願についての国際予備審査の請求に関する一切の件並びに請求及び選択
国の選択を取り下げる件

埼玉県川口市本町四丁目1番8号

科学技術振興事業団

理事長 中 村 守 孝





PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF RECEIPT OF
RECORD COPY

(PCT Rule 24.2(a))

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON

| | |
|---|---|
| Date of mailing (day/month/year) 02 June 1999 (02.06.99) | IMPORTANT NOTIFICATION |
| Applicant's or agent's file reference JA908462 | International application No. PCT/JP99/02305 |

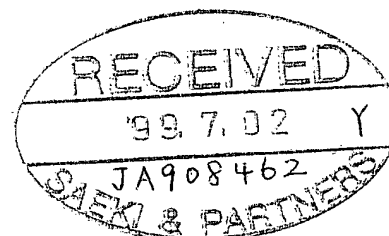
The applicant is hereby notified that the International Bureau has received the record copy of the international application as detailed below.

Name(s) of the applicant(s) and State(s) for which they are applicants:

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION (for all designated States except US)
MORI, Satoshi et al (for US)

| | | |
|---|---|--------------------------|
| International filing date | : | 30 April 1999 (30.04.99) |
| Priority date(s) claimed | : | 30 April 1998 (30.04.98) |
| Date of receipt of the record copy by the International Bureau | : | 21 May 1999 (21.05.99) |
| List of designated Offices | : | |

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE
National : AU, CA, JP, US

**ATTENTION**

The applicant should carefully check the data appearing in this Notification. In case of any discrepancy between these data and the indications in the international application, the applicant should immediately inform the International Bureau.

In addition, the applicant's attention is drawn to the information contained in the Annex, relating to:

- ☒ time limits for entry into the national phase
- ☒ confirmation of precautionary designations
- ☒ requirements regarding priority documents

A copy of this Notification is being sent to the receiving Office and to the International Searching Authority.

| | |
|--|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Authorized officer: M. Sakai Telephone No. (41-22) 338.83.38 |
|--|--|

INFORMATION ON TIME LIMITS FOR ENTERING THE NATIONAL PHASE

The applicant is reminded that the "national phase" must be entered before each of the designated Offices indicated in the Notification of Receipt of Record Copy (Form PCT/IB/301) by paying national fees and furnishing translations, as prescribed by the applicable national laws.

The time limit for performing these procedural acts is **20 MONTHS** from the priority date or, for those designated States which the applicant elects in a demand for international preliminary examination or in a later election, **30 MONTHS** from the priority date, provided that the election is made before the expiration of 19 months from the priority date. Some designated (or elected) Offices have fixed time limits which expire even later than 20 or 30 months from the priority date. In other Offices an extension of time or grace period, in some cases upon payment of an additional fee, is available.

In addition to these procedural acts, the applicant may also have to comply with other special requirements applicable in certain Offices. It is the applicant's responsibility to ensure that the necessary steps to enter the national phase are taken in a timely fashion. Most designated Offices do not issue reminders to applicants in connection with the entry into the national phase.

For detailed information about the procedural acts to be performed to enter the national phase before each designated Office, the applicable time limits and possible extensions of time or grace periods, and any other requirements, see the relevant Chapters of Volume II of the PCT Applicant's Guide. Information about the requirements for filing a demand for international preliminary examination is set out in Chapter IX of Volume I of the PCT Applicant's Guide.

GR and ES became bound by PCT Chapter II on 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, and may, therefore, be elected in a demand or a later election filed on or after 7 September 1996 and 6 September 1997, respectively, regardless of the filing date of the international application. (See second paragraph above.)

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

CONFIRMATION OF PRECAUTIONARY DESIGNATIONS

This notification lists only specific designations made under Rule 4.9(a) in the request. It is important to check that these designations are correct. Errors in designations can be corrected where precautionary designations have been made under Rule 4.9(b). The applicant is hereby reminded that any precautionary designations may be confirmed according to Rule 4.9(c) before the expiration of 15 months from the priority date. If it is not confirmed, it will automatically be regarded as withdrawn by the applicant. There will be no reminder and no invitation. Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying the designated State concerned (with an indication of the kind of protection or treatment desired) and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.

REQUIREMENTS REGARDING PRIORITY DOCUMENTS

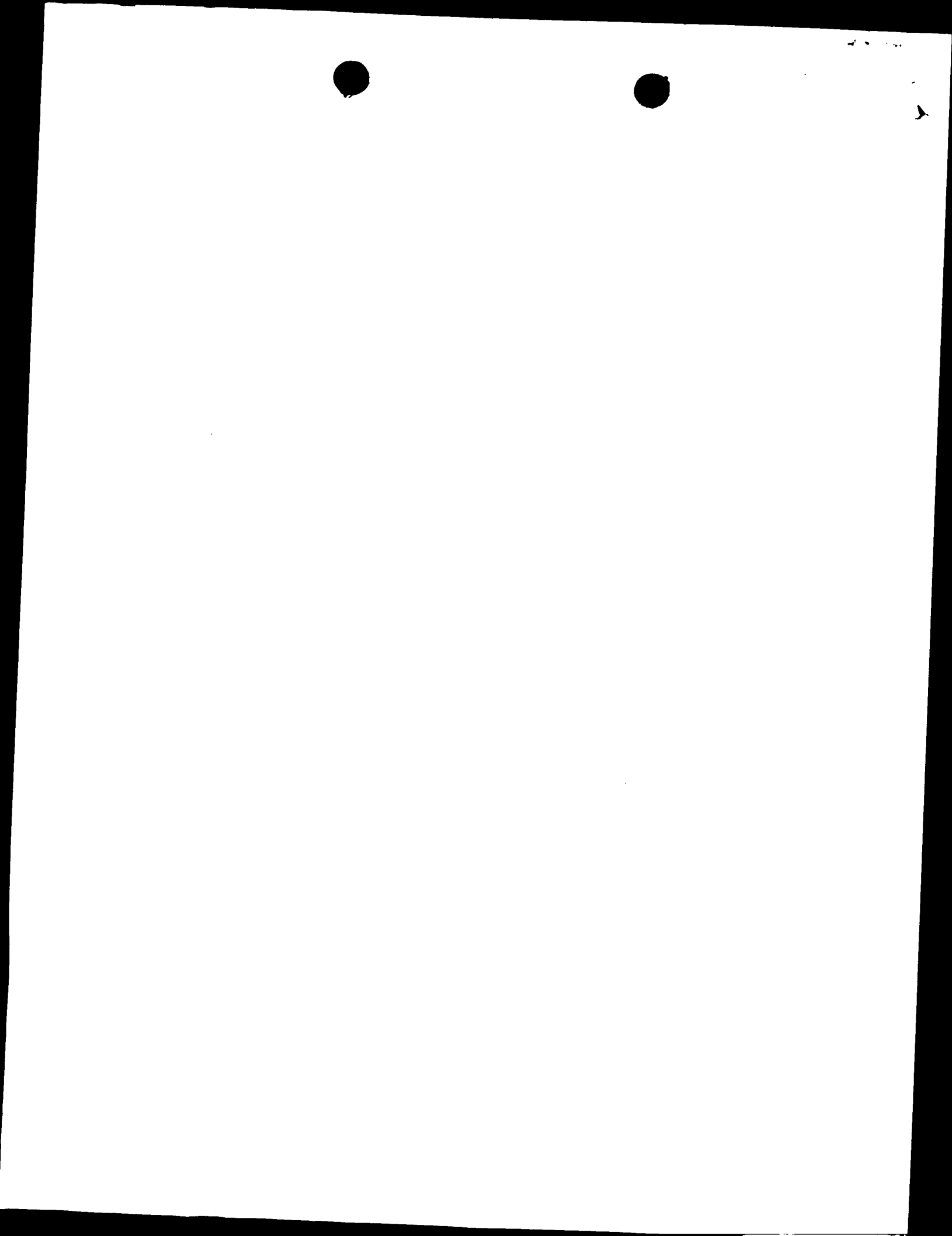
For applicants who have not yet complied with the requirements regarding priority documents, the following is recalled.

Where the priority of an earlier national, regional or international application is claimed, the applicant must submit a copy of the said earlier application, certified by the authority with which it was filed ("the priority document") to the receiving Office (which will transmit it to the International Bureau) or directly to the International Bureau, before the expiration of 16 months from the priority date, provided that any such priority document may still be submitted to the International Bureau before that date of international publication of the international application, in which case that document will be considered to have been received by the International Bureau on the last day of the 16-month time limit (Rule 17.1(a)).

Where the priority document is issued by the receiving Office, the applicant may, instead of submitting the priority document, request the receiving Office to prepare and transmit the priority document to the International Bureau. Such request must be made before the expiration of the 16-month time limit and may be subjected by the receiving Office to the payment of a fee (Rule 17.1(b)).

If the priority document concerned is not submitted to the International Bureau or if the request to the receiving Office to prepare and transmit the priority document has not been made (and the corresponding fee, if any, paid) within the applicable time limit indicated under the preceding paragraphs, any designated State may disregard the priority claim, provided that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Where several priorities are claimed, the priority date to be considered for the purposes of computing the 16-month time limit is the filing date of the earliest application whose priority is claimed.



TENT COOPERATION TRE Y

PCT

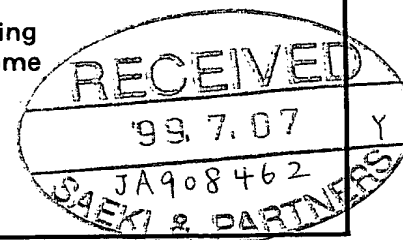
NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
9th floor, Taka-ai Building
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON



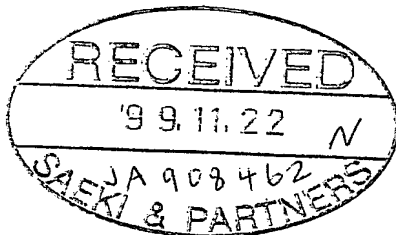
| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 29 June 1999 (29.06.99) | |
| Applicant's or agent's file reference JA908462 | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No. PCT/JP99/02305 | International filing date (day/month/year) 30 April 1999 (30.04.99) |
| International publication date (day/month/year) Not yet published | Priority date (day/month/year) 30 April 1998 (30.04.98) |
| Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al | |

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

| <u>Priority date</u> | <u>Priority application No.</u> | <u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u> | <u>Date of receipt of priority document</u> |
|--------------------------|---------------------------------|---|---|
| 30 April 1998 (30.04.98) | 10/137685 | JP | 25 June 1999 (25.06.99) |

| | |
|--|--|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Juan Cruz Telephone No. (41-22) 338.83.38 |
|--|--|





PATENT COOPERATION TREATY

WO 99/57249
PCT/JP99/02305

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
Taka-ai Building, 9th floor
15-2, Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku
Tokyo 103-0027
JAPON

| | | |
|---|--|------------------|
| Date of mailing (day/month/year) 11 November 1999 (11.11.99) | | |
| Applicant's or agent's file reference JA908462 | | IMPORTANT NOTICE |
| International application No. PCT/JP99/02305 | International filing date (day/month/year) 30 April 1999 (30.04.99) | |
| Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al | | |

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,EP,JP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
CA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 11 November 1999 (11.11.99) under No. WO 99/57249

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

| | |
|---|------------------------------------|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer J. Zahra |
| Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Telephone No. (41-22) 338.83.38 |

PATENT COOPERATION TREATY

PCT
NOTIFICATION OF TRANSMITTAL
OF COPIES OF TRANSLATION
OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 72.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SAEKI, Norio
 Taka-ai Building, 9th floor
 15-2, Nihonbashi 3-chome
 Chuo-ku
 Tokyo 103-0027
 JAPON



| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 08 September 2000 (08.09.00) | |
| Applicant's or agent's file reference JA908462 | IMPORTANT NOTIFICATION |
| International application No. PCT/JP99/02305 | International filing date (day/month/year) 30 April 1999 (30.04.99) |
| Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION et al | |

1. Transmittal of the translation to the applicant.

The International Bureau transmits herewith a copy of the English translation made by the International Bureau of the international preliminary examination report established by the International Preliminary Examining Authority.

2. Transmittal of the copy of the translation to the elected Offices.

The International Bureau notifies the applicant that copies of that translation have been transmitted to the following elected Offices requiring such translation:

EP,AU,CA,US

The following elected Offices, having waived the requirement for such a transmittal at this time, will receive copies of that translation from the International Bureau only upon their request:

JP

3. Reminder regarding translation into (one of) the official language(s) of the elected Office(s).

The applicant is reminded that, where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report.

It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned (Rule 74.1). See Volume II of the PCT Applicant's Guide for further details.

| | |
|--|---|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35 | Authorized officer Eliott Peretti Telephone No. (41-22) 338.83.38 |
|--|---|

特許協力条約に基づく国際出願
国際予備審査請求書

第 II 章

出願人は、次の国際出願が特許協力条約に従って国際予備審査の対象とされることを請求し、
選択資格のある全ての国を選択する。ただし、特段の表示がある場合を除く。

国際予備審査機関記入欄

| | | | |
|--|-----------------------------|---|--|
| 国際予備審査機関の承認 | | 請求書の受理の日 | |
| 第 I 欄 国際出願の表示 | | 出願人又は代理人の書類記号 JA908462 | |
| 国際出願番号 PCT/JP99/02305 | 国際出願日 (日. 月. 年) 30.04.99 | 優先日 (最先のもの) (日. 月. 年) 30.04.98 | |
| 発明の名称 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子 | | | |
| 第 II 欄 出願人 | | | |
| 氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 科学技術振興事業団 Japan Science and Technology Corporation 〒332-0012 日本国埼玉県川口市本町4丁目1番8号 1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama-ken 332-0012 JAPAN | | 電話番号: 048-226-5619 ファクシミリ番号: 048-226-5652 加入電話番号: | |
| 国籍 (国名): 日本国 JAPAN | | 住所 (国名): 日本国 JAPAN | |
| 氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 森 敏 MORI Satoshi 〒275-0026 日本国千葉県習志野市谷津6-7-2-301 1191番地13 6-7-2-301, Yatsu, Narashino-shi, Chiba-ken, 275-0026 JAPAN | | | |
| 国籍 (国名): 日本国 JAPAN | | 住所 (国名): 日本国 JAPAN | |
| 氏名 (名称) 及びあて名: (姓・名の順に記載; 法人は公式の完全な名称を記載; あて名は郵便番号及び国名も記載) 樋口 恭子 HIGUCHI Kyoko 〒113-0032 日本国東京都文京区弥生1-1-1 1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032 JAPAN | | | |
| 国籍 (国名): 日本国 JAPAN | | 住所 (国名): 日本国 JAPAN | |
| <input checked="" type="checkbox"/> その他の出願人が続表に記載されている。 | | | |



第Ⅱ欄の続き 出願人

この第Ⅱ欄の続きを使用しないときは、この用紙を国際予備審査請求書に含めないこと。

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

鈴木 一矢 SUZUKI Kazuya

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生1-1-1

1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032 JAPAN

国籍(国名)： 日本国 JAPAN

住所(国名)： 日本国 JAPAN

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

西澤 直子 NISHIZAWA Naoko

〒113-0001 日本国東京都文京区白山1-37-9-705

1-37-9-705, Hakusan, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0001 JAPAN

国籍(国名)： 日本国 JAPAN

住所(国名)： 日本国 JAPAN

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

中西 啓仁 NAKANISHI Hiromi

〒113-0032 日本国東京都文京区弥生1-1-1

1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-0032 JAPAN

国籍(国名)： 日本国 JAPAN

住所(国名)： 日本国 JAPAN

氏名(名称)及びあて名：(姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載)

国籍(国名)：

住所(国名)：

☐ その他の出願人が他の続葉に記載されている。



第Ⅲ欄 代理人又は共通の代表者、通知のあて名

下記に記載された者は、☒ 代理人 又は ☐ 共通の代表者 として

☒ 既に選任された者であって、国際予備審査についても出願人を代理する者である。

☐ 今回新たに選任された者である。 先に選任されていた代理人又は共通の代表者は解任された。

☐ 既に選任された代理人又は共通の代表者に加えて、特に国際予備審査機関に対する手続きのために、今回新たに選任された者である。

氏名（名称）及びあて名：（姓・名の順に記載；法人は公式の完全な名称を記載；あて名は郵便番号及び国名も記載）

10266 弁理士 佐伯 憲生 SAEKI Norio

電話番号：

03-5205-2521

ファクシミリ番号：

03-5205-2522

加入電話番号：

〒103-0027 日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2, Nihonbashi 3-chome,

Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

☐ 通知のためのあて名： 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、上記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している場合は、レ印を付す

第Ⅳ欄 国際予備審査に対する基本事項

補正に関する記述：*

1. 出願人は、次のものを基礎として国際予備審査を開始することを希望する。

☐ 出願時の国際出願を基礎とすること。

☐ 明細書に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 請求の範囲に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第19条の規定に基づいてなされた補正（添付した説明書も含む）を基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

☐ 図面に関して

☐ 出願時のものを基礎とすること。

☐ 特許協力条約第34条の規定に基づいてなされた補正を基礎とすること。

2. ☐ 出願人は、特許協力条約第19条の規定に基づく請求の範囲に関する補正を差し替えることによって考慮されることを望む。

3. ☐ 出願人は、国際予備審査の開始が優先日から20月経過後まで延期されることを望む（ただし、国際予備審査機関が、特許協力条約第19条の規定に基づき行われた補正書の写しの受領、又は当該補正を希望しない旨の出願人からの通知を受領した場合を除く（規則69.1(d)））。

（この口は、特許協力条約第19条の規定に基づく期間が満了していない場合のみ、レ印を付すことができる。）

* 記入がない場合は、1)補正がないか又は国際予備審査機関が補正（原本又は写し）を受領していないときは、出願時の国際出願を基礎に予備審査が開始され、2)国際予備審査機関が、見解書又は予備審査報告書の作成開始前に補正（原本又は写し）を受領したときは、これらの補正を考慮して予備審査が開始又は続行される。

国際予備審査を行うための言語は 日本語 であり、

☒ 国際出願の提出時の言語である。

☐ 国際調査のために提出した翻訳文の言語である。

☐ 国際出願の公開の言語である。

☐ 国際予備審査の目的のために提出した翻訳文の言語である。

第Ⅴ欄 国の選択

出願人は、選択資格のある全ての指定国（即ち、既に出願人によって指定されており、かつ特許協力条約第Ⅱ章に拘束されている国）を選択する。

ただし、出願人は次の国の選択を希望しない。：

第VI欄 照合欄

この国際予備審査請求書には、国際予備審査のために、第IVに記載する言語による書類が添付されている。

- | | |
|--|---|
| 1. 国際出願の翻訳文 | 枚 |
| 2. 特許協力条約第34条の規定に基づく補正書 | 枚 |
| 3. 特許協力条約第19条の規定に基づく補正書 (又は、要求された場合は翻訳文)の写し | 枚 |
| 4. 特許協力条約第19条の規定に基づく説明書 (又は、要求された場合は翻訳文)の写し | 枚 |
| 5. 書簡 | 枚 |
| 6. その他 (書類名を具体的に記載する) : | 枚 |

国際予備審査機関記入欄

受 領 未 受 領

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

この国際予備審査請求書には、さらに下記の書類が添付されている。

- | | |
|---|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> 手数料計算用紙 | 3. <input type="checkbox"/> 包括委任状の写し |
| <input checked="" type="checkbox"/> 納付する手数料に相当する特許印紙を 貼付した書面 | 4. <input type="checkbox"/> 記名押印 (署名) に関する説明書 |
| <input checked="" type="checkbox"/> 国際事務局の口座への振込を証明する書面 | 5. <input type="checkbox"/> スクレオチド又はアミグ/機配列表 (クレキシブルディスク) |
| 2. <input type="checkbox"/> 別個の記名押印された委任状 | 6. <input type="checkbox"/> その他 (書類名を具体的に記載する) : |

第VII欄 提出者の記名押印

各人の氏名 (名称) を記載し、その次に押印する。

佐 伯 憲 生



国際予備審査機関記入欄

- 国際予備審査請求書の実際の受理の日
- 規則 80.1(b)の規定による国際予備審査請求書の受理の日の訂正後の日付
- ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理。ただし、以下の4、5の項目にはあてはまらない。 ☐ 出願人に通知した。
- ☐ 規則 80.5により延長が認められている優先日から19月の期間内の国際予備審査請求書の受理
- ☐ 優先日から19月を経過後の国際予備審査請求書の受理であるが規則82により認められる。

国際事務局記入欄

国際予備審査請求書の国際予備審査機関からの受領の日:



第 II 章

P C T

手 数 料 計 算 用 紙

国 際 予 備 審 査 請 求 書 の 附 属 書

国際予備審査機関記入欄

国際出願番号

PCT/JP99/02305

出願人又は代理人の書類記号

JA908462

国際予備審査機関の日付印

出願人

科学技術振興事業団

所定の手数料の計算

1. 特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律（国内法）
第18条第1項第4号の規定による手数料
（予備審査請求料）（注1）

28,000 円 P

2. 取扱手数料（注2）.....

19,600 円 H

3. 所定の手数料の合計

P及びHに記入した金額を加算し、合計額を合計に記入・・

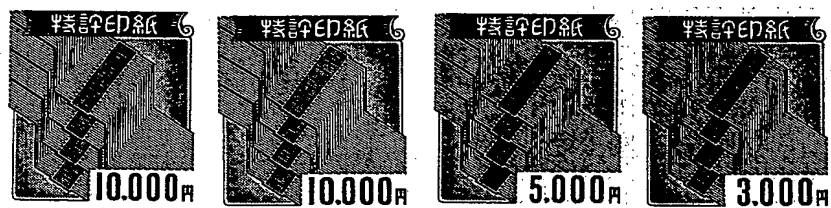
47,600 円

合 計

（注1）法第18条第1項第4号の規定による手数料については、特許印紙をもって納付しなければならない。

（注2）取扱手数料については、国際予備審査機関である日本国特許庁の長官が告示する国際事務局の口座への振り込みを証明する書面を提出することにより納付しなければならない。





予備審査請求手数料

28,000円



ご利用明細

ご来店いただき
ありがとうございます。

 東京三菱銀行

| | | |
|--|-------|----------|
| 年月日 | 取扱店番 | お取引内容 |
| 111018 | 0022 | お振込 |
| 受付通番 | 銀行番号 | 支店番号 |
| 8356 | | |
| 時刻 | 税込手数料 | お取引金額 |
| 14.21 | ¥105* | ¥19,600* |
| お取扱いで ない場合 | 残高 | |
| お取扱金額 | 2万円 | 0円 |
| ご案内 | ¥300* | 0円 |
| お振込先は 東京三菱銀行 内幸町支店 普通 0473286 WIPO-PCT GENEVA様 ご依頼人は タクミツキョウ アシヨ サエキ ノリ オ様 電話 0352052521 | | |



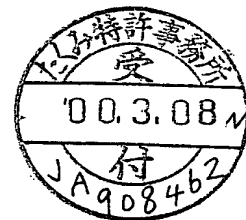
取扱手数料

19,600円



特許協力条約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人

佐 伯 憲 生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル 9階

PCT見解書

(法第13条)
[PCT規則66]

発送日
(日.月.年)

07.03.00

出願人又は代理人
の書類記号

JA908462

応答期間

上記発送日から 2 月以内

国際出願番号

PCT/J P99/02305

国際出願日

(日.月.年)

30.04.99

優先日

(日.月.年)

30.04.98

国際特許分類 (IPC)

Int. Cl⁷ C12N9/00, 15/52, C12P13/04, C07K16/40

出願人 (氏名又は名称)

科学技術振興事業団

1. これは、この国際予備審査機関が作成した 1 回目の見解書である。

2. この見解書は、次の内容を含む。

I ☒ 見解の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ 法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)) に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

3. 出願人は、この見解書に応答することが求められる。

いつ?

上記応答期間を参照すること。この応答期間に間に合わないときは、出願人は、法第13条 (PCT規則66.2(d)) に規定するとおり、その期間の経過前に国際予備審査機関に期間延長を請求することができる。ただし、期間延長が認められるのは合理的な理由があり、かつスケジュールに余裕がある場合に限定されることに注意されたい。

どのように?

法第13条 (PCT規則66.3) の規定に従い、答弁書及び必要な場合には、補正書を提出する。補正書の様式及び言語については、法施行規則第62条 (PCT規則66.8及び66.9) を参照すること。

なお

補正書を提出する追加の機会については、法施行規則第61条の2 (PCT規則66.4) を参照すること。補正書及び/又は答弁書の審査官による考慮については、PCT規則66.4の2を参照すること。審査官との非公式の連絡については、PCT規則66.6を参照すること。

応答がないときは、国際予備審査報告は、この見解書に基づき作成される。

4. 国際予備審査報告作成の最終期限は、PCT規則69.2の規定により 30.08.00 である。

名称及びあて先

日本国特許庁 (IPEA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内 田 俊 生

4 N

8 2 1 4

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



I. 見解の基礎

1. この見解書は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に回答するために提出された差替え用紙は、この見解書において「出願時」とする。)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | | |
|-------------------------------------|---------|--------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ | 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ | ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ | ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- ☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- ☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき見解書を作成した。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
- ☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
- ☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- ☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- ☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項
- ☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この見解書は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第13条 (PCT規則66.2(a)(ii)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|----------------|-------|--------------|---|
| 新規性 (N) | 請求の範囲 | 3-26 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1, 2 | 無 |
| 進歩性 (IS) | 請求の範囲 | 3-21, 25, 26 | 有 |
| | 請求の範囲 | 1, 2, 22-24 | 無 |
| 産業上の利用可能性 (IA) | 請求の範囲 | 1-26 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明

請求の範囲1, 2の発明は、国際調査報告で引用された文献1 (Plant and Soil, Volume 165, Number 2, issued 1994, Kyoko Higuchi et al., "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots", pages 173-179)により、新規性を有しない。

請求の範囲1には、「配列番号1に示されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸が欠失、他のアミノ酸で置換、若しくは他のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素」が包含されるところ、欠失・置換・付加されるアミノ酸数の上限については、請求の範囲のみならず明細書にも記載がなく、当該技術分野の専門家にとって自明なものでもない。そして、任意のニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列は、配列番号1に示されるアミノ酸配列の一部のアミノ酸を欠失・置換・付加することにより導き出せるものであるから、請求の範囲1のニコチアナミン合成酵素には、任意のニコチアナミン合成酵素が包含されることとなる。したがって、文献1に記載されたオオムギ由来のニコチアナミン合成酵素は、請求の範囲1, 2のニコチアナミン合成酵素に包含されるものである。

請求の範囲22-24の発明は、文献1により、進歩性を有しない。

特定のタンパク質に対する抗体は、該特定のタンパク質から、当該技術分野の専門家にとって自明である。

請求の範囲3-21, 25, 26の発明は、国際調査報告で引用されたいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当該技術分野の専門家にとってそれらの文献を含む先行技術からみて自明のものでもない。



- _____

答 弁 書



特許庁審査官 内田 俊生 殿

1. 国際出願の表示 PCT/J P 99/02305

2. 出願人 (代表者)

氏名 (名称)

科学技術振興事業団

JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

あて名

〒332-0012

日本国埼玉県川口市本町四丁目1番8号

1-8, Honcho 4-chome, Kawaguchi-shi, Saitama,

332-0012 JAPAN

国籍

日本国 JAPAN

住所

日本国 JAPAN

3. 代理人

氏 名

(10266) 弁理士 佐伯 憲生

SAEKI Norio



あて名

〒103-0027

日本国東京都中央区日本橋三丁目15番2号

高愛ビル 9階

9th floor, Taka-ai Building, 15-2,

Nihonbashi 3-chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027 JAPAN

4. 通知の日付

07.03.00

5. 答弁の内容

(1) 見解書の概要

審査官殿は、次の文献1を引用されて、請求の範囲1には任意のニコチアナミン合成酵素が包含されており、文献1に記載のオオムギ由来のニコチアナミン合成酵素は請求の範囲1, 2のニコチアナミン合成酵素に包含されるものであるから、請求の範囲1及び2に記載の発明は新規性及び進歩性を欠く旨、御



指摘になりました。

また、請求の範囲 22-24 に記載の発明も文献 1 に記載のタンパク質に対するものを包含することから同様に進歩性を欠く旨、御指摘になりました。

文献 1 : (Plant and Soil, Volume 165, Number 2, issued 1994, Kyoko Higuchi et al., "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots", pages 173-179)

(2) 文献 1 に記載の発明について

審査官殿が引用されております文献 1 は、本件発明の発明者らによるものであり、当該文献は本件明細書においても引用されているものであります（本件明細書、第 5 頁第 3～4 行）。

審査官殿は、文献 1 には、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素が記載されていると御認定になっておられますが、文献 1 にはオオムギ由来のニコチアナミン合成酵素の各種混合物が記載されているのみであり、本件発明における単一物質としてのニコチアナミン合成酵素は記載も開示もされておられません。

即ち、文献 1 には、

「ニコチアナミン合成酵素を SDS-PAGE で 1 バンドとして精製した。」

(文献 1、第 173 頁アブストラクトの最終行)

と記載されておりますように、SDS-PAGE において 1 バンドになる程度までは精製できたことが記載されておりますが、アミノ酸配列を決定できる程度まで精製できたことは全く記載も示唆もされておられません。SDS-PAGE において 1 バンドになった程度では、タンパク質が単一の化学物質として精製・単離されたものであると言えないことは当業者には周知のことであり、文献 1 の記載は、この当時はニコチアナミン合成酵素の精製がこの程度が限度であったことを示すものに過ぎないのであります。

さらに、文献 1 には、その第 176 頁の「鉄欠乏オオムギの根からのニコチアナミン合成酵素の精製」の欄に、種々のカラムクロマトグラフィーにより精製を試みたが、いずれも失敗に終わった旨が記載されております。唯一、SD



S-PAGEの銅染色により1バンドのものが得られた旨が記載されております。また、文献1には、

「しかし、分取用のSDS-PAGEの後、鉄欠乏植物から検出されたこの30kDaのペプチドは、鉄充足オオムギからの2次元電気泳動ゲルにおいて検出できなかった（データ示さず。）。」

（文献1、第176頁右欄下から4行目～1行目）

と記載されており、文献1にデータは示されておりませんが、鉄欠乏オオムギの根からの当該30kDaのペプチドの2次元電気泳動が行われたことを示唆する記載もなされております。文献1に記載のようなSDS-PAGEの1バンドの成分を、実際に2次元電気泳動した後のウェスタンブロットの結果が本件明細書の第12図の右上に示されており、このように多数のスポットに分離されることが明らかにされております。

これらの文献1の記載からしますと、文献1にはSDS-PAGEで1バンドになる程度までのニコチアナミン合成酵素の混合物の精製が可能であることが開示されているに過ぎず、文献1にはニコチアナミン合成酵素をこれ以上の単一物質にいたるまで分離・精製することは不可能であったことが示されているに過ぎないのであります。

（3）本件発明との対比

本件発明は、単一な化学物質としてのニコチアナミン合成酵素に係るものであり、前述してきた文献1に記載のニコチアナミン合成酵素の混合物とは基本的に相違するものであります。

文献1には、SDS-PAGEで1バンドを示すニコチアナミン合成酵素の混合物が記載されておりますが、このバンドを2次元電気泳動にかけますと多数のスポットに分かれます。本件明細書の第12図には、鉄欠乏の根からの2次元電気泳動の後のウェスタンブロットの結果（第12図の右上）が示されております。この第12図において明瞭に示されておりますように、SDS-PAGEで1バンドの成分が2次元電気泳動により複数のスポットとして現れてきます。この各スポットは不純物ではなく、単一な化学物質としてのニコチアナミン合成酵素そのものであることは本件明細書にNAS1～7として記載の



とおりであります。即ち、文献1には、これらの混合物が開示されているに過ぎず、本件発明により初めてこれらの各々が単一の化学物質として分離されたのであります。

換言すれば、本件発明は、文献1においてSDS-PAGEで1バンド以上に精製・分離することができなかったニコチアナミン合成酵素の混合物を、本件発明において初めてニコチアナミン合成酵素の各単一物質として分離することに成功したものであるということであります。

このことは同じく本件発明の発明者らによる添付の参考資料(K.Higuchi, et al., Soil Sci. Plant Nutr., 45(3), 681-691 (1999))に、より詳細に明らかにされております。参考資料の第685頁のFig. 2は本件明細書の第12図に相当するものであり、このように多数の成分がSDS-PAGEの1バンドの中に存在し、この中に存在しているニコチアナミン合成酵素を、ニコチアナミン合成酵素1、2、3、4、5及び6として、それらの遺伝子産物(HvNAS1~6(本件明細書の第10頁の表1参照))の各々のスポットが参考資料第687頁のFig. 4に記載されております。即ち、文献1に記載の「ニコチアナミン合成酵素」はこれらの成分の混合物にすぎないのであります。

したがって、文献1には本件発明に係るニコチアナミン合成酵素の混合物が記載されているだけであり、かつ文献1には本件発明において初めて明らかにされた単一の物質としてのニコチアナミン合成酵素は何ら記載も示唆もされていないのであります。

また、文献1は1994年に発表されたものであり、本件は1998年の優先日に係るものであり、さらに添付の参考資料は1999年に至って発表されたものであります。文献1に記載のSDS-PAGE上で1バンドまで精製された後、単一の物質としてニコチアナミン合成酵素が分離されるまでに約4~5年を要しているということは、とりもなおさずニコチアナミン合成酵素を単一の化学物質として分離してくることが技術的にいかに困難であったかということを如実に示すものでもあります。本件明細書にも記載されておりますように、ニコチアナミン合成酵素は不安定な物質であり、文献1に記載の精製度か

ら、少なくとも部分的なアミノ酸配列を決定できる程度の純度にすることは文献1が発表された当時は殆ど不可能なことでありましたが、本件発明がこれを初めて可能にしたのであります。したがって、この点からみてもニコチアナミン合成酵素を初めて単一の化学物質として分離した本件発明が新規性は勿論のこと、進歩性を有していることは明らかであります。

以上述べてきましたように、文献1には本件発明に係る単一の化学物質たるニコチアナミン合成酵素の混合物が開示されているに過ぎず、しかも文献1には本件発明に係る単一の化学物質たるニコチアナミン合成酵素の存在すら何ら記載も示唆もされておられません。したがって、本件の請求の範囲1-2に記載の発明が任意のニコチアナミン合成酵素を包含するものであったとしても、文献1に単一の化学物質としてのニコチアナミン合成酵素が開示されていない以上、文献1に記載の発明により本件の請求の範囲1-2に記載の発明の新規性及び進歩性が否定されるものではありません。

(4) 請求の範囲22-24に記載の発明について

審査官殿は、見解書におかれまして、特定のタンパク質に対する抗体は自明である旨、御指摘になられておりますが、前述してきましたように本件発明のタンパク質は文献1により新規性及び進歩性を否定されるものではないのでありますから、新規性及び進歩性を有するタンパク質に対する抗体として本件の請求の範囲22-24に記載の抗体も新規性は勿論のこと、進歩性を有するものであります。

(5) まとめ

以上のとおりでありますから、審査官殿の御指摘の本件の請求の範囲1-2及び22-24に記載の発明は、いずれも新規性及び進歩性を有するものであると思料いたしますので、御再考の上、新規性及び進歩性有りとの報告が頂けますようお願いいたします。

6. 添付資料の目録

- (1) 参考資料 K.Higuchi, et al., Soil Sci. Plant Nutr., 45(3),
681-691 (1999)

以 上



Presence of Nicotianamine Synthase Isozymes and Their Homologues in the Root of Graminaceous Plants

Kyoko Higuchi^{*,**}, Hiromi Nakanishi^{*}, Kazuya Suzuki^{*,**},
Naoko K. Nishizawa^{*}, and Satoshi Mori^{*,**}

**Laboratory of Plant Molecular Physiology, Department of Applied Biological Chemistry,
The University of Tokyo, Tokyo, 113-8657 Japan; and **CREST, Japan Science and
Technology Corporation (JST), Tokyo, 305-0047 Japan*

Received January 25, 1999; accepted in revised form May 31, 1999

Nicotianamine synthase (NAS) catalyzes the synthesis of nicotianamine, which is an intermediate in the biosynthetic pathway of mugineic acid family phytosiderophores (MAs). Using polyclonal anti-NAS antibodies and recombinant NAS proteins, we identified five NAS isozymes and one NAS homologue in Fe-deficient barley roots using two-dimensional electrophoresis followed by Western blot analysis. Other unidentified NAS homologues that were induced by Fe-deficiency were also detected in barley roots. Western analysis enabled to detect NAS homologues in wheat, oats, rice, maize, and sorghum roots. In graminaceous species, both the amount and number of NAS homologues were correlated with the total NAS activity and Fe-deficiency tolerance. The NAS isoform patterns differed among the graminaceous plants.

Key Words: Fe-deficiency, graminaceous plant, mugineic acid, nicotianamine synthase, Western blot analysis.

Graminaceous plants secrete iron-chelators, called mugineic acid-family phytosiderophores (MAs), from their roots to solubilize sparingly soluble iron in the rhizosphere. MAs is the only class of phytosiderophores so far identified in plants (Takagi 1976). The amount of phytosiderophores secreted increases dramatically under Fe-deficiency stress. In graminaceous plants, tolerance to Fe-deficiency is considered to depend on the amount of MAs plant roots secrete under Fe-deficiency stress (Takagi et al. 1984; Marschner et al. 1987; Singh et al. 1993).

Increase in the activity of nicotianamine synthase (NAS) and nicotianamine aminotransferase (NAAT) is essential to the enhancement of MAs biosynthesis in Fe-deficient plants and therefore to tolerance to Fe-deficiency (Kanazawa et al. 1994; Higuchi et al. 1996a). Recently, we have purified NAS and NAS-like proteins from Fe-deficient barley roots and isolated 7 related cDNA clones of NAS from barley (Higuchi et al. 1999). In this study, we detected a number of NAS-like proteins in barley and in five other graminaceous species by Western blot analysis. The correlations between the amount of NAS-like protein or its isoform patterns with NAS activity are discussed.



MATERIALS AND METHODS

Preparation of polyclonal antibodies to NAS. Two mice were immunized with a total of 100 μ g NAS peptides which were the same as those used to determine the partial amino acid sequences described in the report of Higuchi et al. (1999). For the first injection, the immunogen was emulsified in complete Freund's adjuvant. For the second and subsequent injections, incomplete Freund's adjuvant was used. After the 4th induction, whole blood was collected and the antiserum was stored at -80°C until use.

Western blot analysis. The procedure described by Damerval et al. (1986) using trichloroacetic acid (TCA) and acetone extraction of proteins was applied with slight modifications. The plant materials were crushed in liquid N_2 using a mortar and pestle, and the powder was then resuspended in a cold solution of 100 g L^{-1} TCA in acetone with 1 mg g^{-1} 2-mercaptoethanol (2-ME). Proteins were allowed to precipitate for 1 h at -20°C , and then centrifuged at $16,000 \times g$ for 30 min at 4°C . The supernatant solution was discarded and the pellet containing both proteins and residues was rinsed with cold acetone containing 1 mg g^{-1} 2-ME for 1 h at -20°C , and then centrifuged at $16,000 \times g$ for 30 min at 4°C . The supernatant solution was discarded, the pellet was dried under reduced pressure, then the proteins were dissolved with sample buffer (50 $\mu\text{L mg}^{-1}$ dry pellet: 9.5 M urea, 20 g L^{-1} Triton X-100, 50 mg g^{-1} 2-ME). The suspension was centrifuged at $16,000 \times g$ for 10 min at room temperature, then the residues were removed. The supernatant solution was applied to SDS-PAGE (Laemmli 1970) or two-dimensional electrophoresis (2D-PAGE) (O'Farrell 1975). The peptides were transferred onto a PVDF membrane by electroblotting and used for Western analysis, which was performed using the NAS antibodies described above with a secondary antibody that was a conjugate of goat anti-mouse IgG (H+L) and horseradish peroxidase (Wako, Osaka, Japan). The blot was stained with diaminobenzidine.

Expression of recombinant NAS proteins in *Escherichia coli*. PCR mutagenesis was used to introduce *EcoRI* and *NcoI* sites close to the first ATG into the seven *nas* cDNAs (Higuchi et al. 1999). Restriction sites were also introduced near the first stop codon of the seven *nas* cDNAs. *PstI* and *BamHI* sites were introduced into *hvnas1*, *hvnas2*, *hvnas3*, and *hvnas6*, a *BamHI* site into *hvnas4*, and *HindIII* and *BamHI* sites into *hvnas5-1* and *hvnas5-2*. The following primers were used for the N-terminal regions (the *EcoRI* and *NcoI* sites are underlined).

For *hvnas1*, *hvnas4*, and *hvnas6*:

5'-GAGAGAGAGAAATTCGCCATGGATGCCAGACAAGGAG-3'.

For *hvnas2* and *hvnas3*:

5'-GAGAGAGAGAAATTCGCCATGGCTGCCAGACAAC-3'.

For *hvnas5-1* and *hvnas5-2*:

5'-GAGAGAGAGAAATTCGCCATGGAGGCCGAAAACGGCGAG-3'.

The following primers were used for the C-terminal regions (the *PstI*, *HindIII*, and *BamHI* sites are underlined).

For *hvnas1*:

5'-GAGAGAGAGAGGATCCCTGCAGCTTCAATCAAAAGGCCAGCTC-3' (*PstI* and *BamHI* sites).

For *hvnas2*, *hvnas3*, and *hvnas6*:

5'-GAGAGAGAGAGGATCCCTGCAGCGATCAAAAGGCCACTTCGGC-3' (*PstI* and *BamHI* sites).



For *hvnas4*:

5'-GAGAGAGAGGATCCCTCGAGCAATCAGAAGGCCACTTCCGC-3' (*Bam*HI site).

For *hvnas5-1* and *hvnas5-2*:

5'-GAGAGAGAGGATCCAAGCTTAATTTAAGCACTCATTTTCAC-3' (*Hind*III and *Bam*HI sites).

The appropriate restriction fragments containing the coding sequences of the seven cDNAs were excised from the PCR products and cloned into pMAL-c2 (New England Biolabs) to give pMAL-NAS, which were introduced into *E. coli* XL1-Blue. The recombinant bacteria were cultured in Luria-Bertani (LB) medium containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tetracycline at 37°C until the OD₆₀₀ of the culture medium reached a value of 0.5. At this time, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was added to a final concentration of 0.3 mM to induce the production of the recombinant protein. After 4 h, a crude extract from the cells was prepared, and recombinant fusion proteins were purified using 'Amylose Resin' as described in the manufacturer's manual for the pMAL kit.

*Nco*I-*Bam*HI fragments containing the coding sequences of *hvnas1*, *hvnas2*, *hvnas3*, *hvnas4*, *hvnas5-2*, and *hvnas6* were excised from the PCR products and cloned into pET-16b (Novagen) to give pET-NAS, which were introduced into *E. coli* BL21 (DE3). The recombinant bacteria were cultured in LB medium containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicillin at 37°C until the OD₆₀₀ of the culture medium reached a value of 0.5. At this time, IPTG was added to a final concentration of 0.3 mM to induce the production of the recombinant protein. After 4 h, the cells were harvested and suspended in SDS-PAGE sample buffer (O'Farrell 1975).

Assay of NAS activity. Enzyme solutions were equilibrated with reaction buffer (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM dithiothreitol, 10 μM (*p*-amidinophenyl)methanesulfonyl fluoride (*p*-APMSF), 10 μM trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64), pH 8.7) and concentrated by ultrafiltration using Ultrafree C3LGC NMWL10000 (Millipore Co.). The details of the method used to detect NAS activity were described in the report of Higuchi et al. (1996a).

Identification of six *nas* gene products on 2D-PAGE gels. Recombinant NAS proteins expressed using pET-NAS were isolated by SDS-PAGE and electroelution. Each recovered NAS was mixed with sample buffer (9.5 M urea, 20 g L⁻¹ Triton X-100, 50 mg g⁻¹ 2-ME) and applied to 2D-PAGE.

Plant materials. Barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Ehimehadaka no. 1), oats (*Avena sativa* L. cv. Yakushin), wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Arona), maize (*Zea mays* L. cv. Alice), sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench. cv. Big Jim), and rice (*Oryza sativa* L. cv. Nihonbare) were cultured as previously described (Higuchi et al. 1996a).

NAS activity in roots. Each aliquot of 0.5 g of frozen root tissue was crushed into a fine powder in liquid N₂ using a mortar and pestle, homogenized with extraction buffer, and then the NAS activity of the crude extract was detected following the method of Higuchi et al. (1999).

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of anti-NAS polyclonal antibodies

Polyclonal antibodies were raised against the 33 plus 32 kDa peptides, which consisted of the mixture of NAS isozymes used to determine the partial amino acid sequences of NAS



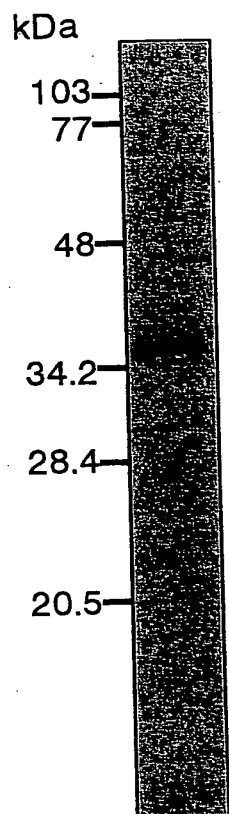


Fig. 1. Western blot analysis of total protein extracted from Fe-deficient barley roots with TCA/acetone. 40 μ g of protein was loaded on the gel. 125 g L⁻¹ acrylamide slab gels were used for SDS-PAGE. A 10⁻⁴ dilution of the antisera was used to detect NAS or NAS-like proteins.

(Higuchi et al. 1999). SDS-PAGE followed by Western blot analysis of total protein extracted from Fe-deficient barley roots by the TCA/acetone method indicated that a 10⁻⁴ dilution of the antisera specifically recognized NAS, and the molecular weight of the NAS band was 35–36 kDa (Fig. 1). This value matched well the molecular weights deduced from the sequences of the *nas* cDNAs (Higuchi et al. 1999), because NAS proteins extracted by the TCA/acetone method were intact. The 33 plus 32 kDa peptides as the antigen were extracted and purified under native conditions, thus NAS was partially degraded by some proteases (Higuchi et al. 1999).

NAS and NAS-like proteins in barley

More than seven protein spots were detected in extracts from Fe-deficient barley roots by 2D-PAGE followed by Western blot analysis (Fig. 2). All the proteins were induced by Fe-deficiency in roots. These results coincide with the presence of a number of NAS genes that were induced by Fe-deficiency (Higuchi et al. 1999). The pI values of these spots (5.0–5.5) also matched well those deduced from the *nas* cDNA sequences.

The molecular weights of most of the protein spots were 35–36 kDa, and a few spots showed a molecular weight of about 30 kDa. The deduced molecular weights of *hvnas1*–*hvnas4* and *hvnas6* proteins were 35–36 kDa, and those of *hvnas5-1* and *hvnas5-2* proteins were 28.2 and 30.1 kDa, respectively. *hvnas5-1* is a deletion clone of *hvnas5-2* (Higuchi et al. 1999). Since no NAS-like proteins under 30 kDa were detected in the Western blot analysis, *hvnas5-1* was considered to be an artifact produced during the preparation of the cDNA library.



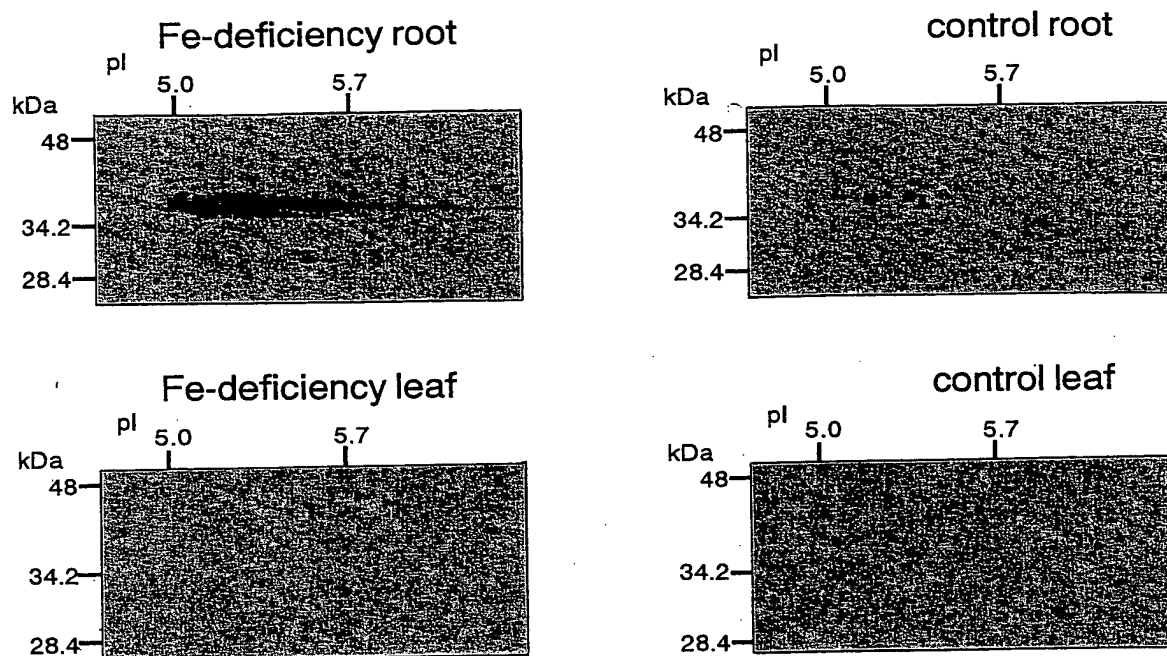


Fig. 2. Western blot analysis of total protein extracted from barley with TCA/acetone. 125 g L⁻¹ acrylamide slab gels were used for 2D-PAGE. Either 200 μ g of root protein or 500 μ g of leaf protein was loaded on the gel.

In both control leaf and Fe-deficient leaf, few spots were observed which was in agreement with the fact that no signals were detected in leaves by Northern analysis (Higuchi et al. 1999). In the case of barley, MAs may be synthesized mainly in roots. Even if nicotianamine (NA) also plays a key role as an endogenous chelator of divalent metal cations (Stephan et al. 1994) in leaf, the amount of NA required may be lower than that for MAs-synthesis in the roots.

Since the deduced amino acid sequences of *hvnas1*–*hvnas6* were homologous to each other with 57–95% identity (Higuchi et al. 1999), we considered that the antisera recognized a wide range of NAS and NAS-like proteins.

NAS activity of *nas* gene products

Since all the gene products of the seven related *nas* clones were assumed to be present among the proteins detected by Western blot analysis, we tried to confirm the enzymatic function of each protein and to identify each protein individually on the 2D-PAGE gel.

Higuchi et al. (1999) previously confirmed the enzymatic function of the *hvnas1* gene product. To confirm the enzymatic functions of the other *nas*-like gene (*hvnas2*, 3, 4, 5-1, 5-2, and 6) products, these genes were expressed as maltose-binding protein-fusions (MBP-NASs) in *E. coli*. MBP-NASs were purified using Amylose Resin affinity columns, and 0.5 μ g of purified MBP-NAS was used for each enzyme assay (Fig. 3). MBP-HvNAS1, 2, 3, 4, and 6 showed a NAS activity, while MBP-HvNAS5-1 and 5-2 did not (Fig. 3A), even when 5 μ g was used (data not shown). When the protein with the *hvnas5* sequence was purified from barley roots, it lacked the NAS activity (Higuchi et al. 1999).

The same 0.5 μ g MBP-NAS samples used to confirm the NAS activity were analyzed by



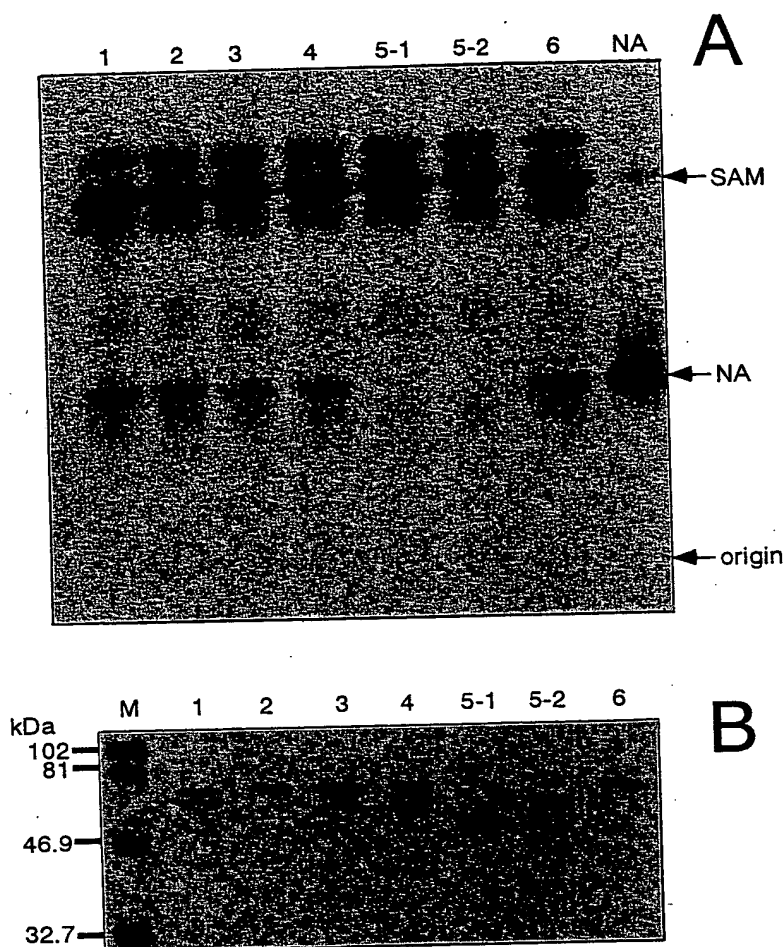


Fig. 3. Confirmation of the NAS activity of seven barley *nas* gene products. A: TLC analysis of NAS activity assay mixtures of MBP-NAS fusion proteins. 0.5 μ g of each fusion protein was used for the enzyme assay. B: SDS-PAGE of MBP-NAS fusion proteins. 125 g L⁻¹ acrylamide slab gels were used for SDS-PAGE and 0.5 μ g of each sample was loaded. The gels were stained with CBB. Lane 1, HvNAS1; lane 2, HvNAS2; lane 3, HvNAS3; lane 4, HvNAS4; lane 5-1, HvNAS5-1; lane 5-2, HvNAS5-2; lane 6, HvNAS6; NA, standard nicotianamine; M, molecular weight marker.

SDS-PAGE (Fig. 3B). The molecular weight of MBP was about 40 kDa, and the deduced molecular weights of HvNAS1, 2, 3, 4, 5-1, 5-2, and 6 were 35.1, 35.8, 36.0, 35.4, 28.8, 30.1, and 35.4 kDa, respectively (Higuchi et al. 1999). Except for MBP-HvNAS3, the molecular weight of the major band in each lane coincided with the deduced molecular weight. The minor band just above the major band in lane 3 coincided with the deduced molecular weight of MBP-HvNAS3. In each lane, proteins with molecular weights lower than the deduced values were assumed to be degradation products, because anti-NAS antibodies recognized these proteins (data not shown).

Although MBP was stable in *E. coli*, MBP-NAS was vulnerable to degradation in *E. coli*. Moreover, the amount of MBP-NAS produced in *E. coli* was lower than that of MBP alone. Frequently, the recombinant *E. coli* strains stopped producing MBP-NAS. Therefore, NAS was considered to be toxic to *E. coli*. Since S-adenosylmethionine (SAM) is a substrate of NAS, overexpression of NAS could reduce the size of the SAM pool, which might inhibit the growth of *E. coli*. Interestingly, MBP-HvNAS5, which lacked the NAS activity, was produced rather stably. NAS was also vulnerable to degradation by proteases during extraction from barley roots (Higuchi et al. 1999). The NAS activity may be strictly regulated to prevent the deficiency of SAM, which is an essential precursor for other metabolites, and the excess NAS in Fe-deficient barley roots may be degraded immediately.

Identification of six *nas* gene products on the 2D-PAGE gel

NAS protein should be cleaved from MBP-NAS by Factor Xa according to the manufacturer's manual for the pMAL kit. However, since Factor Xa could not cleave NASs from MBP-NASs, NASs without any tag were expressed using pET-16b. Recombinant NASs were purified by SDS-PAGE and electroelution and then applied to 2D-PAGE. The N-terminal amino acid sequence of each recombinant NAS recovered from SDS-PAGE was sequenced with a protein sequencer. HvNAS5 was used as an internal standard to identify other protein spots, because its molecular weight is quite different from that of other NASs and it can be easily distinguished from others on 2D-PAGE. HvNAS1, 2, 3, 4, and 6 were

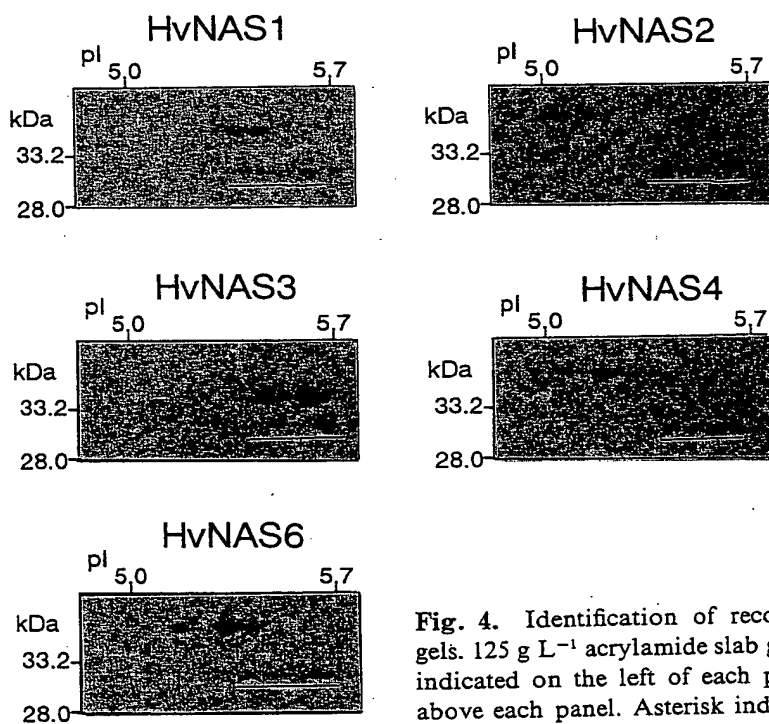


Fig. 4. Identification of recombinant NAS proteins on 2D-PAGE gels. 125 g L⁻¹ acrylamide slab gels were used. The molecular weights are indicated on the left of each panel, while the pI values are indicated above each panel. Asterisk indicates HvNAS5.

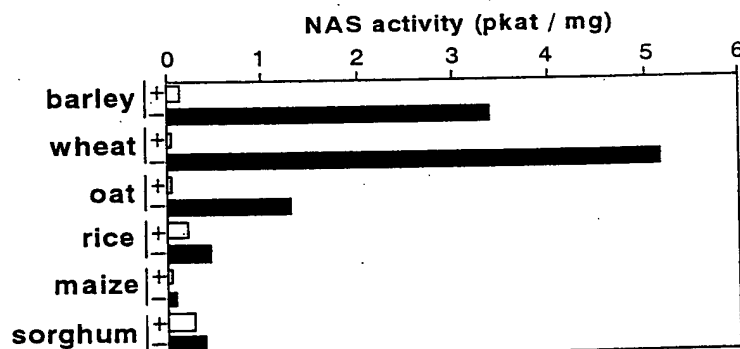


Fig. 5. NAS activity. Root materials were derived from 12 plants in each species. 0.5 g fresh weight was extracted from frozen well-homogenized roots. Each value is a mean ($n=2$). Open pattern: control plant. Closed pattern: Fe-deficient plant.



individually applied to 2D-PAGE with HvNAS5, then the gels were stained with CBB (Fig. 4). The molecular weights and pI values of each NAS closely matched the deduced values

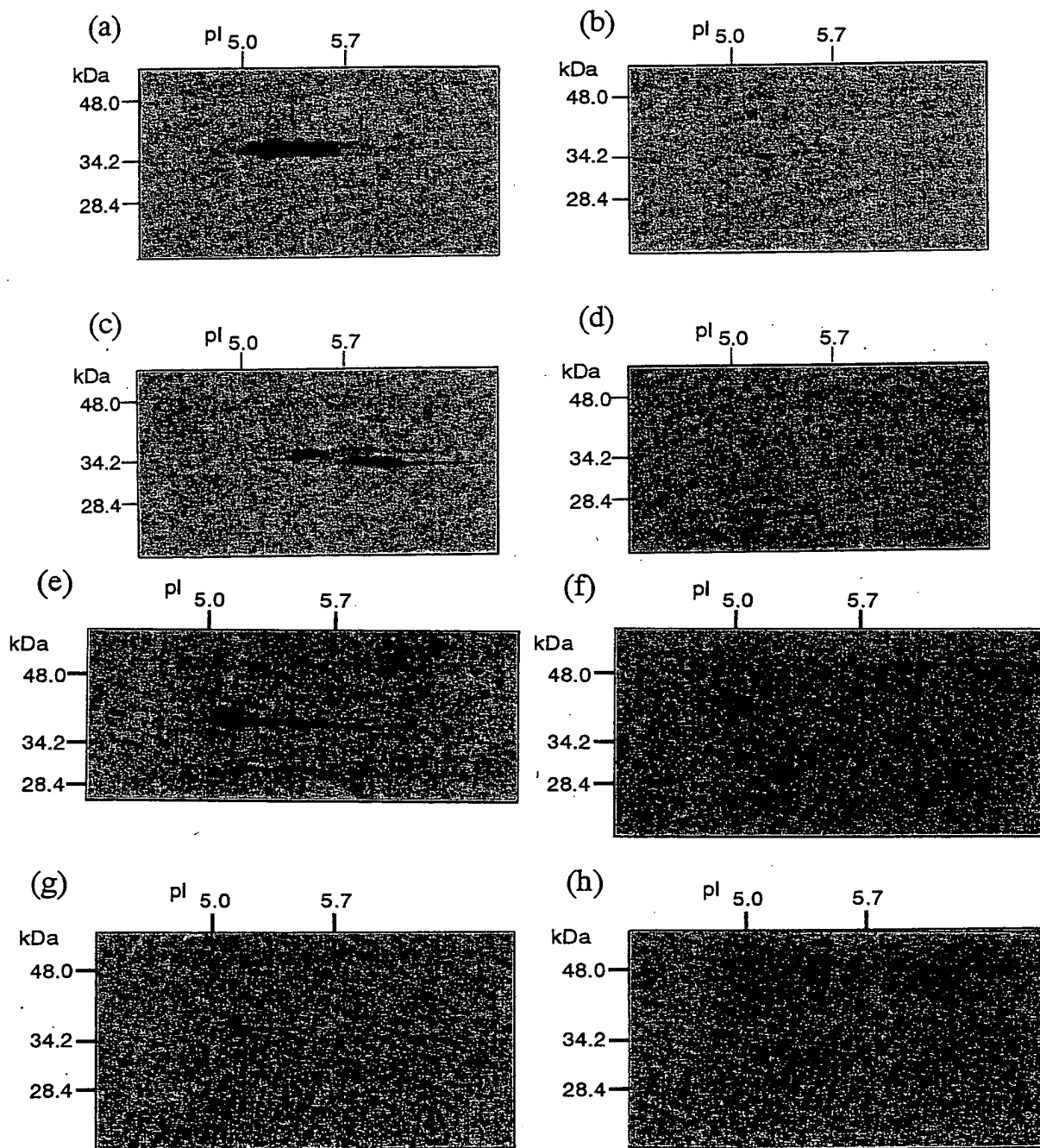


Fig. 6. Western blot analysis of total protein extracted from several graminaceous plants with TCA/acetone. 125 g L⁻¹ acrylamide slab gels were used for 2D-PAGE and 200 µg of each root protein was loaded. (a) and (b), barley; (c) and (d), wheat; (e) and (f), oats; (g) and (h), rice; (i) and (j), maize; (k) and (l), sorghum; (a), (c), (e), (g), (i), and (k), Fe-deficient roots; (b), (d), (f), (h), (j), and (l), control roots. The molecular weights are indicated on the left of each panel, while the pI values are indicated above each panel.



(Higuchi et al. 1999). However, the molecular weight of recombinant HvNAS3 was lower than the deduced value. Therefore, the position of HvNAS3 on the 2D-PAGE gel could not be determined exactly. The smaller molecular weight of recombinant HvNAS3 coincided with the results shown in Fig. 3B. The C-terminal region of HvNAS3 may be vulnerable to proteases in *E. coli*.

Each of the six recombinant NAS were dispersed into three spots on the 2D-PAGE gels. Each set of 3 spots showed the same molecular weight, but different pI values. The N-terminal amino acid sequence of each recombinant NAS recovered from SDS-PAGE was sequenced with a protein sequencer, and the sequences for each set of 3 spots were identical. Acid phosphatase or alkaline phosphatase treatments had no effect. Presently, it is not clear why each recombinant NAS was separated into 3 spots on the 2D-PAGE.

NAS in various cereals

NAS activity was detected in the roots of both Fe-deficiency tolerant (barley, wheat, and oats) and Fe-deficiency susceptible (rice, maize, and sorghum) cereals (Römheld 1987) (Fig. 5). In all the species, Fe-deficiency induced NAS activity. The NAS activity ranged from high in barley, wheat, and oats, to low in rice, maize, and sorghum. Since the use of E-64 as a protease inhibitor improved the procedure applied to extract NAS proteins (Higuchi et al. 1999) and the activity was detected in the crude extracts directly, the difference in the NAS activity of each species was more distinct than that previously reported (Higuchi et al. 1996a).

Western blot analysis of each graminaceous plant using anti-NAS polyclonal antibody is shown in Fig. 6. NAS-like proteins were detected in all the species tested. The amount of each NAS homologue was determined from the size of the spots. The number or amount of each NAS homologue was correlated with the differences in NAS activity; in the subfamily

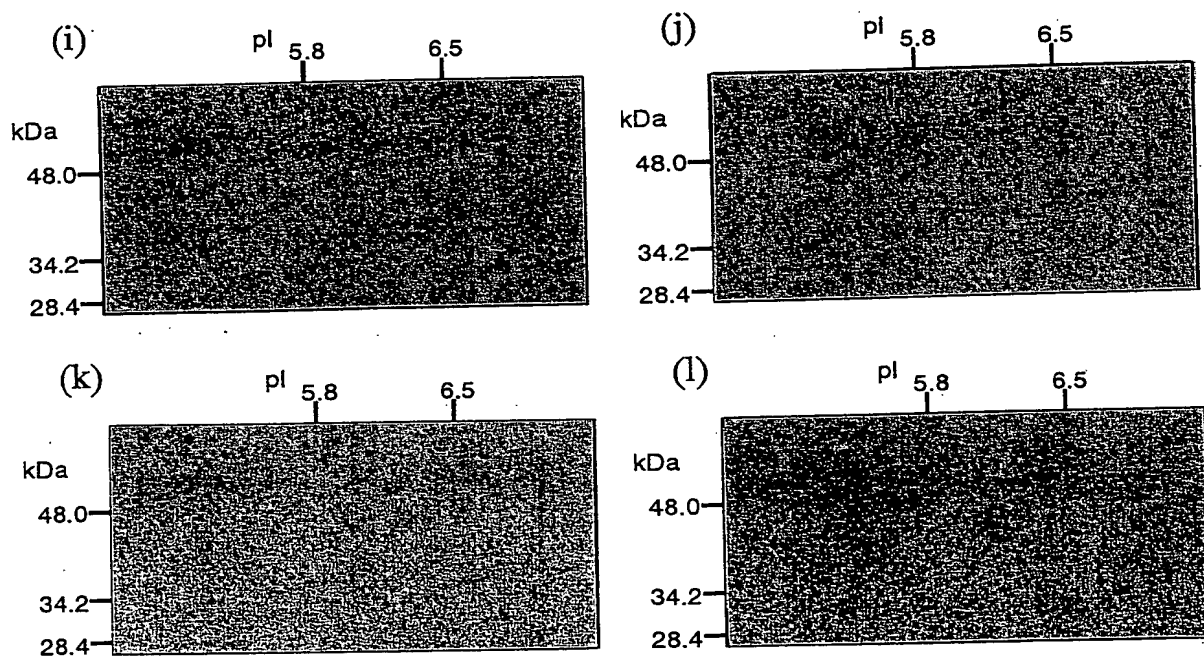


Fig. 6. Continued.



Pooideae (barley, wheat, and oats), Fe-deficiency strongly induced several isoforms of NAS or NAS-like proteins, and the isoform patterns were similar. On the other hand, in rice and the subfamily Panicoideae (maize and sorghum), Fe-deficiency weakly induced NAS or NAS-like proteins, and there were a few detectable spots. In the subfamily Pooideae, the molecular weights of NAS were about 35 kDa. However, in addition to about 35 kDa proteins, a NAS-like protein with a molecular weight of approximately 40 kDa was observed in control rice and NAS-like proteins with a molecular weight of approximately 70 kDa were observed in maize and sorghum. Moreover, the pI values of the NAS-like proteins in maize and sorghum were higher than those in the subfamily Pooideae.

Rice had fewer isoforms than the Pooideae subfamily, and there was a small amount of NAS-like protein. We identified NAS-like rice EST clones in the database, and their sequences were very similar to barley NAS. Therefore, the low NAS activity in rice may simply result from a lower level of NAS gene expression. The pI values of NAS-like proteins in the subfamily Panicoideae were different from those in the subfamily Pooideae. It is possible that the amino acid sequences of these proteins are not so similar to those of barley NAS, and then the relative activity of NAS in the subfamily Panicoideae is lower than that in the subfamily Pooideae.

Arabidopsis thaliana is a species that uses the strategy-I mechanism of iron acquisition. NA is also found in strategy-I plants, where it is proposed to play a key role as an endogenous chelator of divalent metal cations (Stephan et al. 1994). However, Fe-deficiency does not enhance NAS activity in strategy-I plants such as tobacco (Higuchi et al. 1995) and tomato (Higuchi et al. 1996b). In rice, maize, and sorghum, the amounts of NAS protein and activity were not so low in control roots, and were weakly induced by Fe-deficiency.

We also found three *nas* gene homologues in the *A. thaliana* genome database (accession no., AB005245, AC003114, AB011476). The coding regions of two of the NAS homologues, AB005245 and AB011476, were very similar to each other and both were located on chromosome 5. Predicted pI values were 6.28 and 6.14. On the other hand, the AC003114 sequence was different, and was located on chromosome 1. The predicted pI value was 5.66. Three isoforms of NAS were tentatively identified in rice, maize, and sorghum (Fig. 6). We found 19 NAS-like rice EST clones in the database, which were classified into two types with very similar putative coding regions. The program Clustal W categorized barley NASs into three types: Type 1, *nas1*; Type 2, *nas2*, 3, 4, and 6; Type 3, *nas5*. Therefore, it is assumed that originally two types of *nas* genes may have been present in higher plants and that the copy number of one of these tend to increase. The origin of *nas5* in barley remains to be elucidated.

Based on the data described above, it is possible that the ancestor of the Gramineae acquired the ability to induce the expression of NAS in the case of Fe-deficiency, and subsequently both the copy number and the level of expression of NAS increased in the process of evolution of the subfamily Pooideae. Comparison of rice, Pooideae, and Panicoideae genomes showed that the rice genome may have been related to the genome of ancestral grass (Devos and Gale 1997). Since Fe-deficiency strongly induces all NAS-like proteins in the Pooideae, as shown in Fig. 6, it is difficult to assume that the cis-element of each NAS had been independently altered to promote a higher expression. In the Pooideae, iron-responsive trans-elements of NAS probably enhance NAS expression more strongly than in the Oryzodae and the Panicoideae. We plan to identify the iron responsive cis and trans elements of NAS in future.



Acknowledgments. Seeds of *Triticum aestivum* L. cv. Arona were kindly given by Prof. V. Römheld, Hohenheim University. We thank Dr. M. Takahashi, Mr. M. Tani, Mr. O. Maeda, and Mr. S. Watanabe for preparation of the Fe-deficient plant materials. We are deeply indebted to Dr. T. Sasakuma, Yokohama City University, for the critical reading of the manuscript in taxonomy.

REFERENCES

- Damerval, C., de Vienne, D., Zivy, M., and Thiellement, H. 1986: Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, **7**, 52-54
- Devos, K.M. and Gale, M.D. 1997: Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol. Biol.*, **35**, 3-15
- Higuchi, K., Kanazawa, K., Nishizawa, N.K., and Mori, S. 1996a: The role of nicotianamine synthase in response to Fe nutrition status in Gramineae. *Plant Soil*, **178**, 171-177
- Higuchi, K., Nishizawa, N.K., Römheld, V., Marschner, H., and Mori, S. 1996b: Absence of nicotianamine synthase activity in the tomato mutant 'Chloronerva.' *J. Plant Nutr.*, **19**, 1235-1239
- Higuchi, K., Nishizawa, N.K., Yamaguchi, H., Römheld, V., Marschner, H., and Mori, S. 1995: Response of nicotianamine synthase activity to Fe-deficiency in tobacco plants as compared with barley. *J. Exp. Bot.*, **289**, 1061-1063
- Higuchi, K., Suzuki, K., Nakanishi, H., Yamaguchi, H., Nishizawa, N.K., and Mori, S. 1999: Cloning of nicotianamine synthase genes, novel genes involved in the biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiol.*, **119**, 471-479
- Kanazawa, K., Higuchi, K., Nishizawa, N.K., Fushiya, S., Chino, M., and Mori, S. 1994: Nicotianamine aminotransferase activities are correlated to the phytosiderophore secretions under Fe-deficient conditions in Gramineae. *J. Exp. Bot.*, **45**, 1903-1906
- Laemmli, U.K. 1970: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680
- Marschner, H., Römheld, V., and Kissel, M. 1987: Localization of phytosiderophore release and of iron uptake along with intact barley roots. *Physiol. Plant.*, **71**, 157-172
- O'Farrell, P.H. 1975: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007-4021
- Römheld, V. 1987: Existence of two different strategies of the acquisition of iron in higher plants. In *Iron Transport in Microbes, Plants and Animals*, Ed. G. Winkelmann, D. van der Helm, and J.B. Neilands, p. 353-374, VCH Publishers, Weinheim
- Singh, K., Chino, M., Nishizawa, N.K., Ohata, T., and Mori, S. 1993: Genotypic variation among Indian graminaceous species with respect to phytosiderophore secretion. In *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*, Ed. P.J. Randall, p. 335-339, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht
- Stephan, U.W., Schmidke, I., and Pich, A. 1994: Phloem translocation of Fe, Cu, Mn and Zn in *Ricinus* seedlings in relation to the concentrations of nicotianamine, an endogenous chelator for divalent metal ions, in different seedling parts. *Plant Soil*, **165**, 181-188
- Takagi, S. 1976: Naturally occurring iron-chelating compounds in oat- and rice-root washing. I. Activity measurement and preliminary characterization. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **22**, 4232-4233
- Takagi, S., Nomoto, K., and Takemoto, S. 1984: Physiological aspect of mugineic acid, a possible phytosiderophore of graminaceous plants. *J. Plant Nutr.*, **7**, 469-477





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

| | | |
|---|-----------|---|
| <p>(51) 国際特許分類6 C12N 9/00, 15/52, C12P 13/04, C07K 16/40</p> | <p>A1</p> | <p>(11) 国際公開番号 WO99/57249</p> <p>(43) 国際公開日 1999年11月11日(11.11.99)</p> |
| <p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02305</p> <p>(22) 国際出願日 1999年4月30日(30.04.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/137685 1998年4月30日(30.04.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION)[JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</p> <p>森 敏(MORI, Satoshi)[JP/JP] 〒275-0026 千葉県習志野市谷津6-7-2-301 Chiba, (JP)</p> <p>樋口恭子(HIGUCHI, Kyoko)[JP/JP] 鈴木一矢(SUZUKI, Kazuya)[JP/JP] 中西啓仁(NAKANISHI, Hiromi)[JP/JP] 〒113-0032 東京都文京区弥生1-1-1 Tokyo, (JP)</p> <p>西澤直子(NISHIZAWA, Naoko)[JP/JP] 〒113-0001 東京都文京区白山1-37-9-705 Tokyo, (JP)</p> | | <p>(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p> |
| <p>(54)Title: NICOTIANAMINE SYNTHASE AND GENE ENCODING THE SAME</p> <p>(54)発明の名称 ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A nicotianamine synthase is isolated and purified. Then the gene of this enzyme is cloned and the base sequence and amino acid sequence thereof are determined. This gene is employed in constructing plants, in particular, grass plants highly tolerant to iron deficiency. A nicotianamine synthase involved in the mugineic acid biosynthesis pathway; the amino acid sequence thereof; a gene encoding the same; a vector containing this gene; cells transformed by the vector; a process for producing nicotianamine by using the same; plants transformed by the gene encoding the nicotianamine synthase; and an antibody against the nicotianamine synthase.</p> | | |

(57)要約

本発明は、ニコチアナミン合成酵素を精製単離し、この遺伝子をクローニングし、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定し、この遺伝子を用いて鉄欠乏に対する耐性の強い植物、特にイネ科植物を提供することを目的とするものである。

本発明は、ムギネ酸の生合成経路におけるニコチアナミン合成酵素、そのアミノ酸配列、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター、当該ベクターで形質転換された細胞、それを用いたニコチアナミンの製造方法、ニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子で形質転換された植物、及び、ニコチアナミン合成酵素に対する抗体に関する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|-----|---------|----|-------------------|----|------------|
| AE | アラブ首長国連邦 | DM | ドミニカ | KZ | カザフスタン | RU | ロシア |
| AL | アルバニア | EES | エストニア | LC | セントルシア | SD | スーダン |
| AM | アルメニア | ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | SE | スウェーデン |
| AT | オーストリア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SG | シンガポール |
| AU | オーストラリア | FR | フランス | LR | リベリア | SI | スロヴェニア |
| AZ | アゼルバイジャン | GA | ガボン | LS | レソト | SK | スロヴァキア |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB | 英国 | LT | リトアニア | SL | シエラ・レオネ |
| BB | バルバドス | GE | グルジア | LV | ルクセンブルグ | SN | セネガル |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MC | モナコ | SZ | スワジランド |
| BF | ブルキナ・ファソ | GN | ギニア | MD | モルドヴァ | TD | チャード |
| BG | ブルガリア | GW | ギニア・ビサウ | MG | マダガスカル | TG | トーゴ |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TJ | タジキスタン |
| BR | ブラジル | HR | クロアチア | ML | マリ | TZ | タンザニア |
| BY | ベラルーシ | HU | ハンガリー | MN | モンゴル | TM | トルクメニスタン |
| CA | カナダ | ID | インドネシア | MR | モーリタニア | TR | トルコ |
| CF | 中央アフリカ | IE | アイルランド | MX | メキシコ | TT | トリニダード・トバゴ |
| CG | コンゴ | IL | イスラエル | NE | ニジェール | UA | ウクライナ |
| CH | スイス | IN | インド | NL | オランダ | UG | ウガンダ |
| CI | コートジボワール | IS | アイスランド | NO | ノルウェー | US | 米国 |
| CM | カメルーン | IT | イタリア | NZ | ニュージーランド | UZ | ウズベキスタン |
| CN | 中国 | JP | 日本 | PL | ポーランド | VN | ヴェトナム |
| CR | コスタ・リカ | KE | ケニア | PT | ポルトガル | YU | ユーゴスラビア |
| CU | キューバ | KG | キルギスタン | RO | ルーマニア | ZA | 南アフリカ共和国 |
| CY | キプロス | KP | 北朝鮮 | | | ZW | ジンバブエ |
| CZ | チェコ | KR | 韓国 | | | | |
| DE | ドイツ | | | | | | |
| DK | デンマーク | | | | | | |

明 細 書

ニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子

技術分野

本発明は、ムギネ酸の生合成経路におけるニコチアナミン合成酵素、それをコードする遺伝子、当該遺伝子を含有するベクター、当該ベクターで形質転換された細胞、それを用いたニコチアナミンの製造方法、ニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子で形質転換された植物、及び、ニコチアナミン合成酵素に対する抗体に関する。

背景技術

ムギネ酸(mugineic acid)を用いて土中の不溶態Fe(III)をキレート化して吸収するいわゆるストラテジーII(Strategy-II)によって鉄を吸収するイネ科植物は、鉄のキレーター(ファイトシデロフォア)を根から分泌し、根圏の鉄を可溶化して吸収する(Roemheld, 1987)。その分泌量は鉄欠乏ストレスにより顕著に増加する。ムギネ酸類は現在までに知られている唯一のファイトシデロフォアである(Takagi 1976)。したがって、イネ科植物の鉄欠乏耐性能はムギネ酸類の分泌量に依存すると考えられている(Takagi et al. 1984, Roemheld and Marschner 1986, Marschner et al. 1987, Mori et al. 1987, Kawai et al. 1988, Mori et al. 1988, Mihashi and Mori 1989, Singh et al. 1993)。

植物中でのムギネ酸類の生合成経路を第1図に示す。まず、S-アデノシルメチオニン合成酵素によりメチオニンからS-アデノシルメチオニンが作られる。次いで、ニコチアナミン合成酵素により3分子のS-アデノシルメチオニンが結合して1分子のニコチアナミンが生成される。生成したニコチアナミンは、ニコチアナミンアミノ基転移酵素により3'-ケト体になり、続いて何らかの還元酵素により2'-デオキシムギネ酸になる。これがさらに水酸化されてムギネ酸を

はじめとする他のムギネ酸誘導体になる (Mori and Nishizawa 1987, Shojima et al. 1989, Shojima et al. 1990, Ma and Nomoto 1993)。

第1図における右下の化合物の R_1 及び R_2 が水素原子で R_3 が水酸基である化合物がムギネ酸である。 R_1 が水素原子で、 R_2 及び R_3 が水酸基である化合物が、3-ヒドロキシムギネ酸である。また、 R_2 が水素原子で R_1 及び R_3 が水酸基である化合物が3-エピヒドロキシムギネ酸である。

オオムギの根から3種のS-アデノシルメチオニン合成酵素遺伝子が単離されたが、この発現は鉄欠乏で誘導されなかった (Takizawa et al. 1996)。また、オオムギからディファレンシャルスクリーニング法により得られた遺伝子 *Id s 3* はデオキシムギネ酸を水酸化してムギネ酸にする酵素の遺伝子であると推定されるが、この発現は鉄欠乏により強く誘導される (Nakanishi et al. 1993)。さらに、ニコチアナミンアミノ基転移酵素が鉄欠乏オオムギの根から精製・単離され、その2つの遺伝子 *N a a t - A* と *N a a t - B* が単離された (Takahashi et al. 1997)。この *N a a t - A* の発現も、鉄欠乏で誘導された。

S-アデノシルメチオニンからニコチアナミンを合成する反応は、脱炭酸S-アデノシルメチオニンからポリアミンを合成する反応と似ている。しかし、ポリアミン合成酵素と違い、ニコチアナミン合成酵素は3分子のS-アデノシルメチオニンの結合とアゼチジン環の形成を同時に触媒するものである (第1図)。このようなニコチアナミン合成酵素は新しい型の酵素である。以前、本発明者らは鉄欠乏オオムギ根からのニコチアナミン合成酵素の部分精製と活性の発現パターンについて報告した (Higuchi et al. 1994, Higuchi et al. 1995, Kanazawa et al. 1995, Higuchi et al. 1996a, Higuchi et al. 1996b)。しかし、ニコチアナミン合成酵素は抽出、精製の途中で非常に分解され易く、分離精製することは困難であり、部分アミノ酸配列を決定するのに十分な量を得ることも困難であった。

本発明は、ニコチアナミン合成酵素を精製単離し、この遺伝子をクローニングし、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定し、この遺伝子を用いて鉄欠乏に対する耐性の強い植物、特にイネ科植物を提供することを目的とするものである。

発明の開示

本発明は、配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素、又は、その一部のアミノ酸が欠失、他のアミノ酸で置換、若しくはさらに他のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素に関する。

本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子に関する。

また、本発明は、前記の遺伝子を含有してなるベクター、及び、当該ベクターで形質転換された形質転換体に関する。

本発明は、前記形質転換体を用いてニコチアナミンを製造する方法に関する。

また、本発明は、前記の遺伝子が導入された植物、特にイネ科植物、及び、これらの植物を生育させて得られる果実に関する。

本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素をチオールプロテアーゼ阻害剤、好ましくは E-64 の存在下に抽出する方法に関する。

さらに、本発明は、前記のニコチアナミン合成酵素に対する抗体に関する。

図面の簡単な説明

第 1 図は、ムギネ酸類の生合成経路を示すものである。

第 2 図は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程での両者の比較を示すものである。

第 3 図は、30～35 kDa 付近の分取 SDS-PAGE（ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、以下 SDS-PAGE と略す）を示す。横棒は各ゲル片から検出された酵素活性を相対表示したもの。

第 4 図は、ゲルろ過カラムからのニコチアナミン合成酵素活性の溶出パターンを示す。黒丸印（●）は酵素活性を示す。

第 5 図は、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素から決定した 6 つの部分アミノ酸配列と、コンピューター検索により得られたイネの類似の配列とを比較したものである。一致するアミノ酸残基を「:」で示した。

第6図は、HvNAS1のcDNAの全長とそこから予想されるアミノ酸配列を示したものである。下線で示した部分は、前記第5図の部分配列と一致している部分を示している。その右側に塩基の数を示した。左側にアミノ酸残基の数を示した。

第7図は、オオムギから得られた前記の7つのcDNAから予想されるアミノ酸配列の比較を示したものである。全てのクローンで一致するアミノ酸残基を「*」で示した。

第8図は、マルトースバインディングプロテイン-HvNAS1融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー(TLC)で検出した結果を示すものである

第9図は、HvNAS1をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析を示す。

第10図は、HvNAS1をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析を示す。

第11図は、活性検出に用いた粗酵素試料のウエスタンブロット解析を示す。

第12図は、トリクロロ酢酸/アセトンで抽出した全タンパク質のウエスタンブロット解析を示す。

第13図は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程におけるDEAEセファロースFF後での両者の比較を示すものである。

第14図は、鉄欠乏オオムギ及び対照のオオムギの根からの精製過程におけるエーテルトヨパール650M後での両者の比較を示すものである。

第15図は、マルトースバインディングプロテイン-OsNAS1融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー(TLC)で検出した結果を示すものである

第16図は、OsNAS1をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析を示す。

第17図は、マルトースバインディングプロテイン-AiNAS1、AiNAS2又はAiNAS3融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー(TLC)で検出した結果を示すものである

第18図はシロイヌナズナの地上部及び根から全RNAを抽出し、RT-PCRを行っ

た結果を示す。右端は陽性コントロールを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明者らは、以前からニコチアナミン合成酵素の単離を試みてきたが(Higuchi et al. Plant&Soil 165巻 P.173~179 1994)、本酵素は非常に分解され易く、単離精製が非常に困難であり、部分アミノ酸配列を決定するのに十分な量すら得ることが困難であった。その後、チオールプロテアーゼの阻害剤であるトランス-ε-ポキシサクシニル-ロイシルアミド-(4-グアニジノ)ブタン(trans-ε-oxy succinyl-leucylamido-(4-guanidino) butane (以下、E-64と略す)) E-64によって本酵素の分解が強く抑制されることがわかってきた(Higuchi et al. Plant&Soil 178巻 P.171~177 1996 a)。

今回、液体窒素中で細かい粉状になるまで粉碎した根を、0.1 mMのチオールプロテアーゼ阻害剤E-64を含む抽出バッファーと速やかに混合するようにしたところ、ニコチアナミン合成酵素タンパク質を単離することができ、その遺伝子も単離することができた。

さらに、本発明の酵素は、SDS-PAGE後にSDSを除くと活性が回復するが、その回復の程度はかなり低く(Higuchi et al. Plant&Soil 165巻 P.173~179 1994)、SDS-PAGEを行う前にさらに精製度を上げておく必要があった。そこでカラムクロマトグラフィーの方法についても改善が行われた。

また、本発明者らは、本発明の酵素は疎水性が比較的高いため、温和な界面活性剤であるCHAPSをバッファーに加えることにより、分離能が上昇することを見出した。陰イオン交換クロマトグラフィー担体を何種類か試したところ、DEAEセファロースFFとDEAEセファセルがもっとも効果的であった。

TSKゲル・ブチルトヨパール 650 Mに加えて、同じく疎水クロマトグラフィー担体であるTSKゲル・エーテルルトヨパール 650 Mが30~35 kDaの不純物を取り除くために効果的であった。

本発明の酵素は、SDS-PAGE後にSDSを除くと活性が回復する30~35 kDaのペプチドであることが報告されているが、活性は30~35 kDa

の間の広い分子量の範囲で検出されていた（第3図参照）。第3図は、酵素活性を有する分画における分取SDS-PAGEの結果を示す。SDS-PAGEは、11%アクリルアミドスラブゲルで行った。ゲルの一部をクマシーブリリアントブルーで染色し、残りを銅染色し30~35 kDaを7つに切り分けた（短い線で切った場所を表示）。第3図の横棒は、各ゲル片から検出された酵素活性を相対表示したものである。

そこで、これらの分子量を有する蛋白質の中から、ニコチアナミン合成酵素ペプチドを同定するために、鉄欠乏、及び、対照となるオオムギのそれぞれの根から精製したニコチアナミン合成酵素画分に含まれるペプチドをSDS-PAGEを用いて比較した。それぞれのオオムギの根200gから、後述する実施例3に記載の方法に従い本酵素を精製した。

対照の酵素活性は鉄欠乏の1/4であった。

本発明の酵素を精製する各段階の活性画分のペプチド組成をSDS-PAGEで比較したものを、第2図、第13図、及び、第14図に示す。第2図、第13図、及び、第14図は、鉄欠乏のオオムギの根200gからの精製過程（図中（-）で示す）と、対照のオオムギの根200gからの精製過程（図中（+）で示す）との比較を示す。SDS-PAGEは、12.5%アクリルアミドスラブゲル（Laemmli, Nature 227巻 P.680~685 1970）で行った。ゲルは、クマシーブリリアントブルーで染色した。第2図は、DEAEセファロースの前の段階のもので、上段は鉄欠乏のオオムギの根からのものを示し、下段は対照の根からのものを示す。各レーンの、レーン1は粗抽出物200 μ gのものを、レーン2はブチルトヨパール650M後のもの100 μ gのものを、レーン3はヒドロキシルアパタイト後のもの20 μ gのものを、レーン4はブチルトヨパール650M後のもの15 μ gのものを示している。第13図は、DEAEセファロースFF後のもので、各レーン25 μ gのものである。第14図は、エーテルルトヨパール650M後のもので、左側は不活性分画を、右側は活性分画を示し、各画分の1/25を泳動させたものである。

この結果から、DEAEセファロースの前の段階までは鉄欠乏、および対照と

でほとんど違いは見られなかった（第2図参照）。DEAEセファロース後、30および31 kDaのペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかった（第13図参照）。エーテルトヨパール後、31 kDa ペプチドは活性画分から除かれた。新たに32および33 kDaのペプチドが鉄欠乏で誘導されていることがわかる（第14図参照）。32および33 kDa ペプチドからは活性が検出されたが、30 kDa ペプチドからは検出されなかった（第3図参照）。

次に、本発明の酵素の分子量をゲルろ過により決定した。

ニコチアナミン合成酵素のゲルろ過により推定された分子量は、40,000～50,000であると報告されている（Higuchi et al. Plant&Soil 165巻 P.173～179 1994）。しかし、これはSDS-PAGEによる値と一致していなかった。

今回、本発明者らは、バッファーにCHAPSを加えてゲルろ過を行ったところ分離能が上昇し、本酵素の分子量は35,000と推定された（第4図参照）。これは、以前にSDS-PAGEにより推定された値とよく一致した。

第4図は、ゲルろ過カラムからのニコチアナミン合成酵素活性の溶出パターンを示す。黒丸印（●）は酵素活性を示し、実線は280 nmの吸光度を示す。ヒドロキシルアパタイト後の活性画分を、展開バッファー（50 mM Tris、1 mM EDTA、0.1 M KCl、0.05% CHAPS、0.1 mM p-APMSF、3 mM DTT、pH 8.0）で平衡化したセファクリルS300HR（ファルマシア社）カラム（1.5 cm×71 cm、125 ml）に通した。分子量マーカーは、チログロブリン（Mr 670,000）、 γ -グロブリン（Mr 158,000）、オブアルブミン（Mr 44,000）、ミオグロビン（Mr 17,000）を用いた。線流速10 cm/時で展開した。

精製したニコチアナミン合成酵素から部分アミノ酸配列を決定した。

1 kgの鉄欠乏オオムギの根より、後述する実施例3の方法を用いて、前述した30 kDa、32 kDa、および33 kDaのペプチドを精製した。これらを後述する実施例4の方法を用い部分分解した。32と33 kDaのペプチドは完全には分離できなかったが、配列は互いによく似ているかあるいは 32 kDa

は 33 kDa の分解物であると仮定して一緒に分解した。

決定した部分配列からこれらのペプチドは互いによく似ていることがわかった (第 5 図)。また、33 kDa、32 kDa (1) 断片は分解前の分子量とほとんど変わらない分子量であったのでこの配列が本酵素の N 末端領域であると思われた。コンピューター検索によりこれらの配列とよく似た配列を持つ機能未知の遺伝子が、イネおよびシロイヌナズナにあることがわかった。特にイネの EST - cDNA クローン D23792 と D24790 は、前者については 33 アミノ酸残基の重なるのうち 80.0% が同一のアミノ酸、後者については 19 アミノ酸残基の重なるのうち 68.4% が同一のアミノ酸で非常によく似ていた (第 5 図)。

第 5 図は、オオムギ由来のニコチアナミン合成酵素から決定した 6 つの部分アミノ酸配列と、コンピューター検索により得られたイネの類似の配列とを比較したものである。一致するアミノ酸残基を「:」で示した。PCR に使用したプライマーの配列は矢印で示した部分の塩基配列を利用した。

次いで、ニコチアナミン合成酵素 cDNA のクローニングとその塩基配列を決定した。

前述した方法で得られた部分アミノ酸配列からデジェネレートプライマーを合成し、鉄欠乏オオムギ根由来の cDNA に対して PCR を行ったが、目的の DNA は増幅されてこなかった。そこでイネの D23792 と D24790 の配列から、単一の塩基配列を持つプライマー (第 5 図中に矢印で表示) を合成して PCR を行った。NF および NR プライマーを用いた PCR で 205 bp の断片が、IF および IR プライマーを用いた PCR で 274 bp の断片が増幅され、これらは目的の配列を含んでいた。205 bp の断片をプローブとして、鉄欠乏オオムギ根ポリ (A) + RNA 由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ 19 個のクローンが、274 bp の断片をプローブとしてスクリーニングしたところ 88 個のクローンが得られた。

得られたクローンのうち HvNAS1 と名付けたものは、985 bp の翻訳領域を含みそこから推定されるアミノ酸配列は 328 アミノ酸残基で、推定分子量 35,

144であった。この値はSDS-PAGEやゲルろ過から推定された値とよく一致した。32kDaおよび33kDaペプチドから決定された部分アミノ酸配列は全てHvNAS1中に含まれていた(第6図)。

第6図は、HvNAS1のcDNAの全長とそこから予想されるアミノ酸配列を示したものである。下線で示した部分は、前記第5図の部分配列と一致している部分を示している。その右側に塩基の数を示した。左側にアミノ酸残基の数を示した。

予想されるpIは、5.2で未変性等電点電気泳動による値と一致した。HvNAS1の他に極めてよく似た配列を持つ6個のクローンHvNAS2、HvNAS3、HvNAS4、HvNAS5、HvNAS6、HvNAS7が得られた(表1、第7図)。

第7図は、オオムギから得られた前記の7つのcDNAから予想されるアミノ酸配列の比較を示したものである。全てのクローンで一致するアミノ酸残基を「*」で示した。

これらのクローンの塩基配列を配列番号2(HvNAS1)、配列番号4(HvNAS2)、配列番号6(HvNAS3)、配列番号8(HvNAS4)、配列番号10(HvNAS5)、配列番号12(HvNAS6)、配列番号14(HvNAS7)にそれぞれ示す。また、これらのアミノ酸配列を配列番号1(HvNAS1)、配列番号3(HvNAS2)、配列番号5(HvNAS3)、配列番号7(HvNAS4)、配列番号9(HvNAS5)、配列番号11(HvNAS6)、配列番号13(HvNAS7)にそれぞれ示す。

表1 nas クローンの性質

| クローン | アミノ酸 数 | 分子量 | p I | nas1との 相同性 (%) | nas2との 相同性 (%) | nas4との 相同性 (%) |
|--------|-----------|-------|------|-------------------|-------------------|-------------------|
| HvNAS1 | 328 | 35144 | 5.20 | - | | |
| HvNAS2 | 336 | 35839 | 5.07 | 72 | - | |
| HvNAS3 | 336 | 36013 | 5.47 | 72 | 95 | |
| HvNAS4 | 330 | 35396 | 4.91 | 73 | 89 | - |
| HvNAS5 | 283 | 30148 | 5.22 | 61 | 61 | 59 |
| HvNAS6 | 329 | 35350 | 5.07 | 74 | 89 | 88 |
| HvNAS7 | 330 | 35244 | 4.98 | 70 | 86 | 91 |

30 kDa ペプチドから決定された部分アミノ酸配列は全てHvNAS5に含まれていた。これらのクローンの5' および3' 非翻訳領域は互いに似ていなかった。

イネのニコチアナミン合成酵素類似物D23792とD24790は、HvNAS1と約80%の相同性を示した。シロイヌナズナのAC003114とAB005245はHvNAS1と約45%の相同性を示した。

得られたHvNAS1のタンパク質を大腸菌で発現させた。

HvNAS1のORFをPCRで増幅してベクターpMAL-c2にクローニングし、HvNAS1がマルトースバインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。融合タンパク質はIPTGにより発現が強く誘導される。

これを用いて形質転換した大腸菌(E. coli)から粗抽出物を得、融合タンパク質の状態でのニコチアナミン合成酵素活性を測定したところ、ベクターのみでは全く活性は検出されなかったが、HvNAS1のORFを導入した場合には活性が検出された。結果を第8図に示す。

第8図は、マルトースバインディングプロテイン-HvNAS1融合蛋白質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、薄層クロマトグラフィー(TLC)で検出した結果を示すものである。第8図のレーン1は、標準ニコチ

アナミド (NA) であり、レーン 2 はマルトースバインディングプロテイン (SAM) のみを発現している大腸菌のものであり、レーン 3 はマルトースバインディングプロテイン-HvNAS1 融合蛋白質を発現している大腸菌のものである。

後述の実施例 7 で述べる方法によりノーザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、この遺伝子は鉄欠乏の根で強く誘導されていた (第 9 図)。これは本酵素活性の発現パターンと一致していた (Higuchi et al. 1994)。第 9 図は、HvNAS1 をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション解析の結果を示す。全 RNA を、鉄欠乏処理開始後 1 週間のものと、対照のオオムギの葉と根から抽出し、各レーンに 5 μ g の RNA を泳動した。

また、後述の実施例 8 で述べる方法によりサザンハイブリダイゼーション解析を行った。BamHI あるいは EcoRI あるいは Hind III で DNA を断片化したところ複数の断片が検出されたが、現在得られているどのクローンも BamHI および EcoRI では切断されないの、ニコチアナミン合成酵素遺伝子はオオムギおよびイネのゲノム中で複数コピー存在するものと思われた (第 10 図)。

第 10 図は、HvNAS1 をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析の結果を示す。オオムギとイネの葉から抽出したゲノム DNA を BamHI (レーン B)、EcoRI (レーン R)、Hind III (レーン H) で断片化し、各レーンに 10 μ g を泳動した。

さらに、後述する実施例 9 に述べた方法により調製した抗体を用い、実施例 10 で述べる方法によりウエスタンブロット解析を行った。本酵素活性を検出するために調製した粗抽出物中では、本酵素タンパク質は操作中に速やかに分解されることがわかった (第 11 図)。この染色パターンは本酵素活性が SDS-PAGE 後に 30 ~ 35 kDa の間に広がって検出されること (第 3 図参照) と一致した。

第 11 図は、活性検出に用いた粗酵素試料のウエスタンブロット解析の結果を示す。SDS-PAGE は、12.5% アクリルアミドスラブゲルで行った。100 μ g のタンパク質を泳動した。

後述する実施例 10 に述べる方法によりタンパク質を変性させて得られた粗抽

出物中では、35～36 kDaのほぼ単一のバンドとして検出された（第12図）。この値はアミノ酸配列から予想された値とよく一致した。

第12図は、トリクロロ酢酸／アセトンで抽出した全タンパク質のウエスタンブロット解析の結果を示す。SDS-PAGEは12.5%アクリルアミドスラブゲルで行った。100 μ gのタンパク質を泳動した。根については200 μ g、葉については500 μ gのタンパク質を泳動した。

2次元電気泳動を行った後ウエスタンブロット解析を行ったところ数個のスポットが検出された。このことは複数のニコチアナミン合成酵素遺伝子が得られたことと一致していた。どのスポットも鉄欠乏の根で誘導されていた。

また、HvNAS1を制限酵素ApaIとXhoIで切り出した断片をプローブとして、鉄欠乏イネ根ボリ（A）＋RNA由来のcDNAライブラリーをスクリーニングしたところ、20個のクローンが得られた。これらのクローンは配列から3種類に分けられ、そのうち1種類だけがORF全長を含んでおり、これをOsNAS1と名付けた。OsNAS1の塩基配列を配列番号16に、アミノ酸配列を配列番号15に示す。

OsNAS1のORFをPCRで増幅してベクターpMAL-c2にクローニングし、OsNAS1がマルトースバインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。融合タンパク質はIPTGにより発現が強く誘導される。

これを用いて形質転換した大腸菌（E. coli）から粗抽出物を得、融合タンパク質の状態でのニコチアナミン合成酵素活性を測定したところ、HvNAS1と同様に活性が検出された。結果を第15図に示す。第15図はマルトースバインディングプロテイン - OsNAS1融合タンパク質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、TLCで検出した結果を示すものである。第15図のレーン1は標準ニコチアナミン（NA）であり、レーン2はマルトースバインディングプロテイン - OsNAS1融合タンパク質を発現している大腸菌のものであり、レーン3はマルトースバインディングプロテイン - HvNAS1融合タンパク質を発現している大腸菌のものである。

後述の実施例7で述べる方法によりノーザンハイブリダイゼーション解析を行ったところ、オオムギとは違い、イネでは鉄欠乏処理により根だけでなく葉でも発現が誘導されていた（第16図）。第16図はOsNAS1のORFをプローブとしたノ

ーザンハイブリダイゼーション解析の結果を示す。全RNAを、鉄欠乏処理開始後2週間のものと、対照のイネの葉と根から抽出し、各レーンに5 μ gのRNAを泳動した。

コンピューター検索によって得られたHvNAS1に似たアラビドプシス（シロイヌナズナ）の塩基配列をプライマーとして、シロイヌナズナのゲノムDNAに対してPCRを行い、シロイヌナズナのコチアナミン合成酵素遺伝子を3つ得た。これをAtNAS1、AtNAS2、AtNAS3とした。

これらの遺伝子の塩基配列を配列番号18（AtNAS1）、配列番号20（AtNAS2）、配列番号22（AtNAS3）にそれぞれ示す。またこれらのアミノ酸配列を配列番号17（AtNAS1）、配列番号19（AtNAS2）、配列番号21（AtNAS3）にそれぞれ示す。

AtNAS1、AtNAS2、AtNAS3のORFをPCRで増幅してベクターpMAL-c2にクローニングし、それぞれがマルトースバインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。融合タンパク質はIPTGにより発現が強く誘導される。

これを用いて形質転換した大腸菌（E. coli）から粗抽出物を得、融合タンパク質の状態でニコチアナミン合成酵素活性を測定したところ、活性が検出された。結果を第17図に示す。第17図はマルトースバインディングプロテイン - AtNAS融合タンパク質を発現している大腸菌の粗抽出物のニコチアナミン合成活性を、TLCで検出した結果を示すものである。第17図のレーン1は標準ニコチアナミド（NA）とS-アデノシルメチオニンであり、レーン2はマルトースバインディングプロテインのみを発現している大腸菌のものであり、レーン3はマルトースバインディングプロテイン - AtNAS1融合タンパク質を発現している大腸菌のものであり、レーン4はマルトースバインディングプロテイン - AtNAS2融合タンパク質を発現している大腸菌のものであり、レーン5はマルトースバインディングプロテイン - AtNAS3融合タンパク質を発現している大腸菌のものである。

後述の実施例11で述べる方法によりRT-PCRを行ったところ、AtNAS1はシロイヌナズナの根と地上部で発現しており、AtNAS2は根でも地上部でも発現しておらず、AtNAS3は根のみで発現していた（第18図）。第18図のレーンMは分子量マーカーであり、地上部、根及び陽性コントロールについて行った。各部につい

て、レーンCはAtNAS1およびAtNAS2のORF全長を増幅したものであり、レーン1はAtNAS1特異的な増幅断片であり、レーン2はAtNAS2特異的な増幅断片であり、レーン3はAtNAS3特異的な増幅断片である。

ムギネ酸類の分泌量は根乾燥重量1gあたり1日に20mgに達する(Takagi 1993)。本発明者らが検出した粗精製ニコチアナミン合成酵素活性はこれをまかなうのに足りるものであった。本酵素タンパク質が数種類以上存在していること、および活性のない30kDaペプチドが存在していることから、これらのペプチドが会合することにより、3分子のS-アデノシルメチオニンを結合するのに適した構造となり最大の活性を示す、ということも考えられる。しかしゲルろ過により推定された分子量は35,000であった(第4図)。

また、サブユニットが再会合したことによる活性の上昇は現在までのところ観察されていない。さらにマルトースバインディングプロテインとの融合タンパク質の状態でも活性を示したことから、本発明者らは、今のところ本酵素は単量体であると考えている。しかしながら、多量体を形成してより大きな活性を示すという可能性が完全に否定されているわけではない。

S-アデノシルメチオニンからニコチアナミンを合成する反応機構は、S-アデノシルメチオニンをメチル基供与体とするメチル基転移反応や、脱炭酸S-アデノシルメチオニンからスペルミジンやスペルミンを合成する反応と似ていると思われる。これらの酵素に共通の触媒部位についてはタンパク質の高次構造中での等価なアミノ酸残基の配置の類似性が論じられている(Hashimoto et al. 1998, Schluckebier et al. 1995)。

将来、他の植物種のニコチアナミン合成酵素とのアミノ酸配列の比較やX線結晶構造解析から触媒部位が明らかになるであろう。

鉄欠乏によるニコチアナミン合成酵素活性の誘導はイネ科植物に特有の現象であり、ムギネ酸類の大量生合成のために必須である。イネは主要なイネ科作物の中でムギネ酸類の分泌量がもっとも少なく、石灰質土壌での鉄欠乏に非常に弱い。

したがって、本発明のニコチアナミン合成酵素の遺伝子をイネ科植物、特にイネに導入し、鉄欠乏時に大量に発現させるようにして鉄欠乏耐性のある形質転換イネを作出することにより、石灰質土壌でのイネの栽培が可能となる。

イネ科植物においてはこれまで、ニコチアナミンはムギネ酸類を合成する前駆体としての役割しか考えられていなかったが、本発明によりニコチアナミン合成酵素の遺伝子は多重遺伝子族を形成していることが明らかになったことから、イネ科植物においても他に重要な役割をはたしていることが考えられる。

イネ科以外のムギネ酸類を分泌しない植物では、ニコチアナミンは体内で、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} といった2価金属陽イオンのキレーターとして働き、これらの金属の恒常性の維持に貢献するのではないかとされており (Stephan et al. 1994)、イネ科植物でも同様の役割をはたしていることが考えられる。

また、ニコチアナミン合成酵素活性は双子葉植物では、鉄欠乏により誘導されず、本発明の遺伝子の発現も鉄欠乏で誘導されないものと思われる。本発明者らは、シロイヌナズナのニコチアナミン合成酵素遺伝子をクローン化している。これらの遺伝子のプロモーター領域を比較することにより鉄欠乏による遺伝子発現の機構が明らかにされることにより、本発明の遺伝子がイネ科植物のみならず、双子葉植物においても重要な機能を果たすことになるであろう。

配列表の配列番号1に本発明のニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列を示す。

本発明のニコチアナミン合成酵素は、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するもののみならず、ニコチアナミン合成酵素の活性を失わない限り、これらのアミノ酸配列の一部、好ましくは全アミノ酸の50%以下、より好ましくは30%以下、さらに好ましくは10%以下のアミノ酸が欠失してもよいし、他のアミノ酸で置換されていてもよいし、若しくは、他のアミノ酸が更に付加していてもよいし、又は、これらの欠失、置換、付加が組み合わされていてもよい。

また、配列表の配列番号2に本発明のニコチアナミン合成酵素をコードする塩基配列を示す。

本発明のニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子は、配列番号2に示される塩基配列を有するもののみならず、前記したニコチアナミン合成酵素をコードする遺伝子を包含するものである。

本発明の前記遺伝子を導入するベクターとしては、特に制限はないが、種々のベクターに導入することが可能である。好ましいベクターとしては発現ベクターが挙げられる。

本発明の組換えベクターを用いて種々の細胞を常法に従って形質転換することができる。得られた形質転換体を用いてニコチアナミドを大量に製造することができる。これらの方法は当業者によく知られている方法により行うことができる。

本発明の前記遺伝子を導入する宿主としては、各種の細菌類、酵母、細胞類などが挙げられる。好ましくは、植物が挙げられ、特にイネ科植物が好ましい。

遺伝子を導入する方法としては、特に制限はなく、ベクターを使用してもよいし、ゲノムに直接導入してもよい。

本発明のニコチアナミン合成酵素に対する抗体は、常法により本発明のニコチアナミン合成酵素を用いて製造することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもよく、必要ならば、モノクローナル抗体とすることもできる。

さらに、本発明の遺伝子を用いて、植物、好ましくはイネ科植物の品種の改良を行うこともできる。特に、鉄分が欠乏している土壌においても生育できる品種に改良するために、本発明の遺伝子を利用することができる。

実施例

以下に本発明をより具体的に説明するために実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1 (植物材料の調製)

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. cv エヒメハダカ 1 号) を湿らせた濾紙の上で発芽させてから標準的な水耕液 (Mori and Nishizawa 1987) を用いて、自然光のもと、空調設備のない温室で成育させた。水耕液の pH 値は、0.5 N HCl を用いて毎日 5.5 に合わせた。第 3 葉が展開したとき鉄を除いた水耕液に移した。水耕液の pH 値は、0.5 N NaOH を用いて毎日 7.0 に合わせた。対照区は引き続き標準的な水耕液で成育させた。水耕液は 1 週間に 1 回更新した。鉄欠乏処理開始後 2 週間以降に第 4、5 葉に顕著に鉄欠乏クロロシス症状が現れたところで根を採取し、液体窒素で瞬間的に凍結させ、-80℃で使用時まで保管した。

実施例 2 (ニコチアナミン合成酵素活性の測定)

すでに本発明者らが発表した測定方法 (Higuchi et al. 1996a) を改善した方法を用いた。酵素液を反応バッファー (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 3 mM ジチオスレイトール (dithiothreitol) (以下、DTTと略す)、10 μ M (p-アミジノフェニル) メタンサルホニルフルオライド ((p-amidinophenyl) methanesulfonyl fluoride) (以下、p-APMSFと略す)、10 μ M トランス-エポキシサクシニル-ロイシルアミド-(4-グアニジノ) ブタン (trans-epoxysuccinyl-leucylamido-(4-guanidino) butane) (以下、E-64と略す)、pH 8.7) でバッファー交換した。バッファー交換には限外ろ過フィルターユニット、ウルトラフリー C3 LGC NMWL 10000 (ミリポア社) を用いた。カルボキシル基が¹⁴Cで放射能標識されたS-アデノシルメチオニン (アマシャム社) を、終濃度 20 μ M となるように添加し、15 分間 25℃ に保った。反応生成物をシリカゲル LK 6 (ワットマン社) を用い展開溶媒 (フェノール : n-ブタノール : ギ酸 : 水 = 12 : 3 : 2 : 3) で薄層クロマトグラフィーにて分離した。反応生成物の放射活性はイメージアナライザー BAS-2000 (フジフィルム社) で検出した。タンパク質量はブラッドフォード法によるプロテインアッセイキット (バイオラッド社) を用いて測定した。

実施例 3 (ニコチアナミン合成酵素の精製)

以下の操作はすべて 4℃ で行い、ニコチアナミン合成酵素を含む画分には終濃度 10 μ M となるように E-64 を添加した。

凍結した根を液体窒素中で粉状になるまで粉碎し、根 100 g あたり 200 ml の抽出バッファー (0.2 M Tris, 10 mM EDTA, 5% (v/v) グリセリン (glycerol)、10 mM DTT, 0.1 mM E-64, 0.1 mM p-APMSF, 5% (w/v) 不溶性ポリビニルピロリドン (polyvinylpyrrolidone) (PVP)、pH 8.0) を加えて家庭用ジューサーミキサーを用いて混合した。これを、22,500 x g 30 分間で遠心分離し上清を得た。これに硫酸アンモニウムを終濃度 0.4 M となるように加え、1 時間静置した。再度 22,500 x g 30 分間で遠心分離し上清を得た。

T S K ゲル・ブチルトヨパール 6 5 0 M カラム (東ソー社、根 1 0 0 g あたり
カラム体積 1 0 m l) を吸着バッファー (2 0 m M T r i s、1 m M E D T
A、3 m M D T T、0. 4 M (N H₄)₂ S O₄、0. 1 m M p - A P M S F、
p H 8. 0) で平衡化したものに遠心分離上清を通しニコチアナミン合成酵素を
吸着させ、溶出バッファー (1 0 m M T r i s、1 m M E D T A、3 m M
D T T、0. 1 m M p - A P M S F、5 % グリセリン (glycerol)、0. 0 5
% 3 - [(3 - クロラミドプロピル) ジメチルーアンモニオ] プロパンスルホン
酸 (3 - [(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio] propanesulfonic acid) (以下、
C H A P S と略す)、p H 8. 0) で溶出した。

このニコチアナミン合成酵素を含む溶出画分に、塩化カリウムを終濃度 1 0 m
M となるように、1 M リン酸カリウムバッファー (p H 8) を終濃度 1 m M とな
るように加えた。吸着バッファー (1 m M K - P、1 0 m M K C l、3 m M
D T T、0. 1 m M p - A P M S F、p H 8. 0) で平衡化したヒドロキシル
アパタイト 1 0 0 ~ 3 5 0 メッシュ (ナカライ社) をタンパク質 1 0 0 m g あた
り 1 0 m l 用意し、これにニコチアナミン合成酵素を含む画分を通した。ニコチ
アナミン合成酵素は吸着されずにそのまま出てきた。

この素通り画分をすでに述べたように T S K ゲル・ブチルトヨパール 6 5 0 M
カラム (タンパク質 1 0 m g あたりカラム体積 1 m l) に吸着させ、ニコチアナ
ミン合成酵素を溶出した。

吸着バッファー (2 0 m M T r i s、1 m M E D T A、3 m M D T T、
0. 1 m M p - A P M S F、0. 0 5 % C H A P S、p H 8. 0) で平衡
化した D E A E セファロース F F カラム (ファルマシア社、タンパク質 2 5 m g
あたりカラム体積 5 m l) にこのニコチアナミン合成酵素を含む溶出画分を通し、
塩化カリウム濃度 0. 0 5 M、0. 1 M、0. 1 5 M、0. 2 M で段階溶出した。
ニコチアナミン合成酵素は 0. 1 5 M で溶出された。

T S K ゲル・エーテルトヨパール 6 5 0 M カラム (東ソー社、根 1 0 0 g あ
たりカラム体積 1 0 m l) を吸着バッファー (2 0 m M T r i s、1 m M E
D T A、3 m M D T T、1. 2 M (N H₄)₂ S O₄、0. 1 m M p - A P M S
F、p H 8. 0) で平衡化したものにこのニコチアナミン合成酵素を含む溶出画

分を通した。ニコチアナミン合成酵素は吸着されずにそのまま出てきた。これをそのまますでに述べたようにTSKゲル・ブチルトヨパール650Mカラムに吸着させ、ニコチアナミン合成酵素を溶出した。

以上のカラムクロマトグラフィーにより精製されたニコチアナミン合成酵素を含む画分中のペプチドをさらに、11%アクリルアミドゲルを用いてドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下SDS-PAGEと略す）により分離した。SDS-PAGE終了後、ゲルを0.3M塩化銅で染色し(Dzandu et al. 1988)分離したペプチドのバンドを切りだした。このゲル片を0.25M EDTA/0.25M Tris (pH 9.0)で脱色し、抽出バッファー(1% SDS、25mM Tris、192mM グリシン(glycine))と共にすりつぶした。これをSDSを含まないバッファー(25mM Tris、192mM グリシン(glycine))を用いて電気抽出し、ペプチドを回収した。

実施例4 (部分アミノ酸配列の決定)

単離したニコチアナミン合成酵素を、臭化シアンを用いて化学分解した(Gross 1967)。

SDS-PAGE終了後、ニコチアナミン合成酵素を含むゲル片に10倍体積の70% (v/v) ギ酸、1% (w/v) 臭化シアンを加え4℃で1晩かけて分解した。分解終了後、液体部分を回収し、減圧乾固した。これをSDS-PAGE用試料バッファーに溶かし、1晩室温においた後、トリシンを含む16.5%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGE (Schagger and Jagow, 1987)で、分解産物を分離した。泳動終了後PVDF膜にペプチドを転写し(Towbin et al. 1979)アミドブラックで染色した。染色されたバンドを切り分け、エドマン分解気相シーケンサー(モデル492Aプロテインシーケンサー、アプライドバイオシステムズ社)により、各ペプチドのN末端側からアミノ酸配列を決定した。

実施例5 (ニコチアナミン合成酵素遺伝子のクローニング)

得られた部分アミノ酸配列に基づいて合成したプライマーを用い、鉄欠乏オオムギ根由来のcDNAに対してPCRを行った。得られたDNA断片をランダム

プライマーキット（宝酒造）により $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP で放射能標識したものをプローブとして、鉄欠乏オオムギ根ポリ（A）⁺RNA から調整した pYH23 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。単離した cDNA クローンについてサイクルシーケンシングキット（島津分光）および島津 DNA シーケンサー DSQ-1000L を用いて塩基配列を決定した。

HvNAS1 を制限酵素 ApaI と XhoI で切り出した断片をプローブとして、鉄欠乏イネ根ポリ（A）⁺RNA 由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングした。単離した cDNA クローンについてサイクルシーケンシングキット（島津分光）及び島津 DNA シーケンサー DSQ-2000L を用いて塩基配列を決定した。

シロイヌナズナの AC003114 と AB005245 の塩基配列に基づいて合成したプライマーを用い、シロイヌナズナのゲノム DNA に対して PCR を行った。得られた DNA 断片についてサイクルシーケンシングキット（島津分光）および島津 DNA シーケンサー DSQ-1000L を用いて塩基配列を決定した。

決定された塩基配列を配列表の配列番号 2 に示す。

実施例 6（NAS1 タンパク質の大腸菌での発現）

PCR により、HvNAS1 cDNA の最初の ATG の上流に EcoRI サイトを、終止コドンの下流に PstI および BamHI サイトを導入した断片を増幅した。まず得られた増幅産物を EcoRI サイトと BamHI サイトを用いて pBluescript II SK- にサブクローニングし、塩基配列が正しいことを確認した。次に EcoRI サイトと PstI サイトを用いて pMAL-c2 にクローニングし、HvNAS1 がマルトースバインディングプロテインの C 末端に融合した形で発現するようにした。

PCR により、OsNAS1 の最初の ATG の上流に EcoRI サイトを、終止コドンの下流に HindIII サイトを導入した断片を増幅した。まず得られた増幅産物を EcoRI サイトと HindIII サイトを用いて pBluescript II SK- にサブクローニングし、塩基配列が正しいことを確認した。次に EcoRI サイトと HindIII サイトを用いて pMAL-c2 にクロー

ニングし、OsNAS1がマルトースバインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。

PCRにより、AtNAS1、AtNAS2、AtNAS3の最初のATGの上流にEcoRIサイトを、終止コドンの下流にXbaIサイトを導入した断片を増幅した。まず得られた増幅産物をEcoRIサイトとXbaIサイトを用いてpBluescriptII SK-にサブクローニングし、塩基配列が正しいことを確認した。次にEcoRIサイトとXbaIサイトを用いてpMAL-c2にクローニングし、AtNAS1、AtNAS2、AtNAS3がそれぞれマルトースバインディングプロテインのC末端に融合した形で発現するようにした。

この融合タンパク質を発現させる宿主として大腸菌 (E. coli strain XL1-Blue) を用いた。pMAL-c2-HvNAS1とpMAL-c2をそれぞれXL1-Blueに導入し、アンピシリンとテトラサイクリンをそれぞれ50 μ g/ml含むLB培地でOD600が0.5になるまで37℃で培養した。イソプロピル β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を、終濃度0.3 mMとなるように添加し、引き続き37℃で培養し3時間後に集菌した。菌体を0.2 M NaCl、1 mM EDTA、3 mM DTT、0.1 mM E-64を含む10 mM トリスバッファー pH 7.4に懸濁し液体窒素で凍結した。これを氷水中で融解し15秒間の超音波処理を10回行った。得られた粗抽出物のニコチアミン合成酵素活性を実施例2で述べた方法で測定した結果、酵素活性が確認された。

実施例7 (ノーザンハイブリダイゼーション)

HvNAS1 cDNAを、HindIIIとNotIで切断したDNA断片を[α - 32 P] dATPで放射能標識したものをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。オオムギから全RNAを抽出し(Naito et al. 1988)、1.4% アガロースゲル電気泳動により分離した後、ハイボンド-N⁺膜(アマシャム社)に転写した。OsNAS1のORF部分を[α - 32 P] dATPで放射能標識したものをプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った。イネから全RNAを抽出し1.4%アガロースゲル電気泳動により分離した後、ハイボンド-N⁺膜(アマシャム社)に転写した。

ム社)に転写した。膜を0.5M チャーチリン酸 (Church and Gilbert 1984) 1mM EDTA、7% (w/v) SDS、100 μ g/ml サケ精巢DNAを含むバッファーを用いて65℃1晩でプローブとハイブリダイズした。これを40mMチャーチリン酸、1% (w/v) SDSを含むバッファーを用いて65℃10分間洗浄した。この洗浄をもう1回行った後、0.2xSSPE、0.1% (w/v) SDSを含むバッファーを用いて65℃10分間洗浄した。放射活性はイメージアナライザーBAS-2000で検出した。

結果を第9図及び第16図に示す。

実施例8 (サザンハイブリダイゼーション)

オオムギとイネの葉からそれぞれゲノムDNAを抽出した。これをBamHI、あるいはEcoRI、あるいはHindIIIで断片化し、0.8% (w/v) アガロースゲル電気泳動で分離した後、ハイボンド-N⁺膜 (アマシャム社)に転写した。実施例7で述べた方法でハイブリダイズし、放射活性を検出した。

結果を第10図に示す。

実施例9 (ポリクローナル抗体の調製)

ネズミ2匹を約100 μ gの単離したニコチアナミン合成酵素を抗原として免疫した。抗原としては部分アミノ酸配列を決定したものと同一試料を用いた。1回目の免疫時には完全フロイントアジュバント、2回目以降は不完全フロイントアジュバントを用いた。4回免疫した後、全採血を行い、血清を-80℃で保存した。

実施例10 (ウエスタンブロット解析)

トリクロロ酢酸とアセトンを用いて全タンパク質を抽出した (Damerval et al. 1986)。植物体を液体窒素中で粉状になるまで粉碎し、10% (w/v) トリクロロ酢酸、0.1% (v/v) 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol)を含むアセトンと混合した。-20℃で1時間静置してタンパク質を沈殿させた後、16,000 x g 30分遠心して沈殿を回収した。沈殿を0.1% (v/v)

v) 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol) を含むアセトンに懸濁し、
-20℃で1時間静置してタンパク質を沈殿させた後、16,000 x gで30
分遠心して沈殿を回収した。沈殿を減圧乾燥した後、試料バッファー (9.5 M
尿素 (urea), 2% (w/v) トリトン-X-100 (Triton X-100), 5%
(v/v) 2-ME) に溶かし、16,000 x g 10分遠心して上清を得た。
これに含まれるタンパク質をSDS-PAGE、あるいは変性2次元電気泳動
(O'Farrell 1975) で分離した後、PVDF膜に転写した。この膜に対して、実
施例9で調製した抗ニコチアナミン合成酵素抗体を1次抗体、西洋ワサビペルオ
キシダーゼ結合抗マウスIgG (H+L) ヤギ抗体 (和光純薬) を2次抗体とし
て、ジアミノベンジジンで発色しウエスタンブロット解析を行った。

結果を第12図に示す。SDS-PAGEは12.5%アクリルアミドスラブ
ゲルで行った。100 μgのタンパク質を泳動した。根については200 μg、
葉については500 μgのタンパク質を泳動した。

実施例11 (RT-PCR)

シロイヌナズナから全RNAを抽出し、その1 μgを鋳型としてEZ rTth RNA PCR
キット (パーキンエルマー社) を用いてRT-PCRを行った。プライマーはAtNAS1、
AtNAS2、AtNAS3それぞれに特異的なものを用いた。結果を第18図に示す。

産業上の利用可能性

本発明の組換えベクターを用いて種々の細胞を常法に従って形質転換すること
ができ、得られた形質転換体を用いてニコチアナミドを大量に製造することがで
きる。これらの方法は当業者に知られている方法により行うことができる。

また、本発明の遺伝子を用いて、植物、好ましくはイネ科植物の品種の改良を
行うこともできる。特に、鉄分が欠乏している土壌においても生育できる品種に
改良するために、本発明の遺伝子を利用することができる。

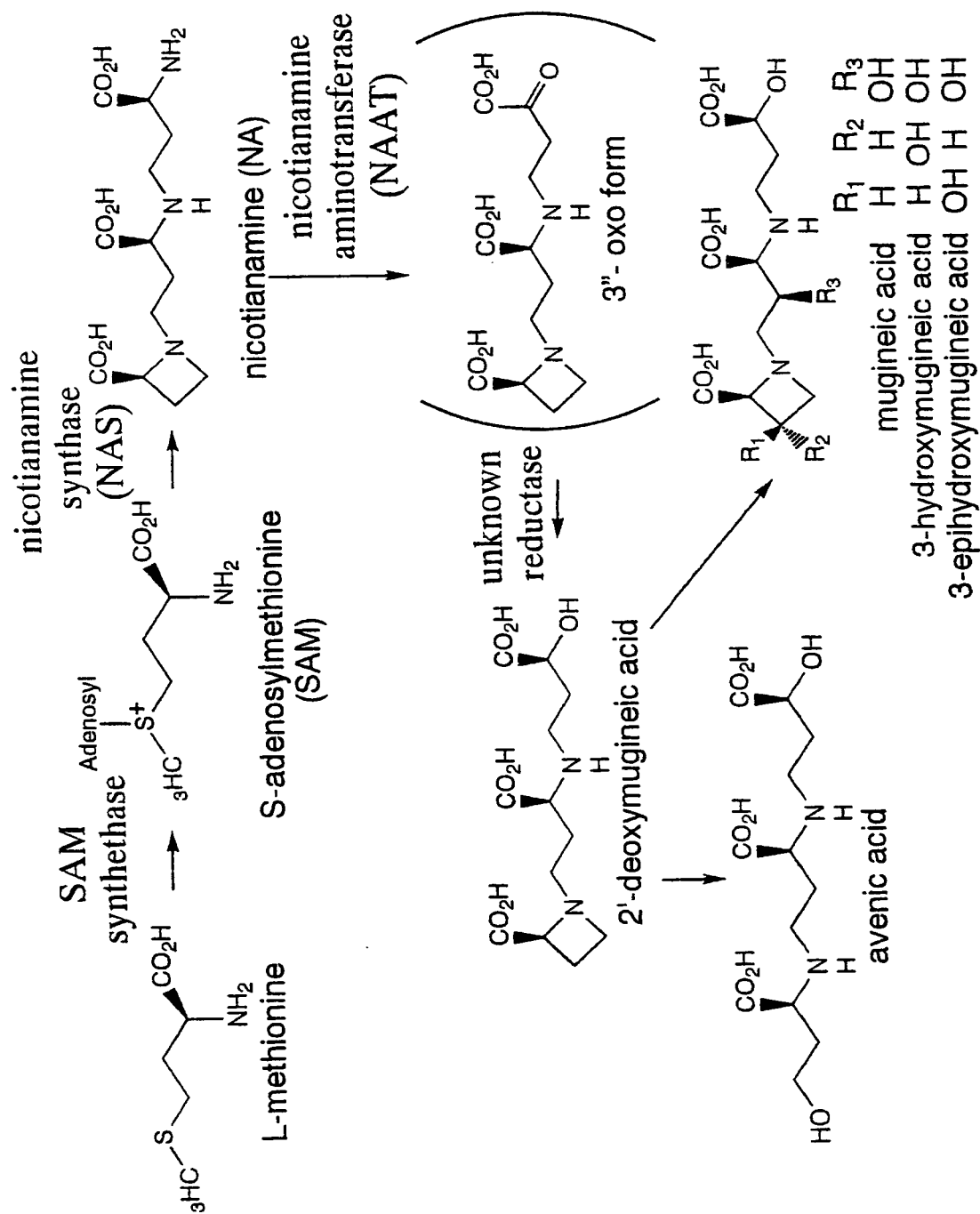
請 求 の 範 囲

1. 配列表の配列番号 1 に示されるアミノ酸配列、又は、その一部のアミノ酸が欠失、他のアミノ酸で置換、若しくは他のアミノ酸が付加されてなるアミノ酸配列を有するニコチアナミン合成酵素。
2. オオムギ由来のものである請求の範囲第 1 項に記載のニコチアナミン合成酵素。
3. 配列表の配列番号 1、3、5、7、9、11 又は 13 に示されるアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載のニコチアナミン合成酵素。
4. アラビドプシス由来のものである請求の範囲第 1 項に記載のニコチアナミン合成酵素。
5. 配列表の配列番号 17、19 又は 21 に示されるアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項又は第 4 項に記載のニコチアナミン合成酵素。
6. イネ由来のものである請求の範囲第 1 項に記載のニコチアナミン合成酵素。
7. 配列表の配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を有する請求の範囲第 1 項又は第 6 項に記載のニコチアナミン合成酵素。
8. 請求の範囲第 1～7 項のいずれかに記載されるニコチアナミン合成酵素のアミノ酸配列をコードする遺伝子。
9. 遺伝子が cDNA である請求の範囲第 8 項に記載の遺伝子。
10. 配列表の配列番号 2、4、6、8、10、12 又は 14 に示される塩基配列を有する請求の範囲第 8 項又は第 9 項に記載の遺伝子。
11. 配列表の配列番号 18、20 又は 22 に示される塩基配列を有する請求の範囲第 8 項又は第 9 項に記載の遺伝子。
12. 請求の範囲第 8～11 項のいずれかに記載の遺伝子を含有してなるベクター。
13. ベクターが発現ベクターである請求の範囲第 12 項に記載のベクター。
14. 請求の範囲第 12 項又は第 13 項に記載されたベクターで形質転換された形質転換体。

15. 外来遺伝子が、配列表の配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20又は22に示される塩基配列を有する遺伝子である請求の範囲第14項に記載の形質転換体。
16. 宿主が細菌類である請求の範囲第14項又は第15項に記載の形質転換体。
17. 宿主が高等植物細胞である請求の範囲第14項又は第15項に記載の形質転換体。
18. 請求の範囲第14～17項のいずれかに記載された形質転換体を用いてニコチアナミンを製造する方法。
19. 請求の範囲第8～10項のいずれかに記載の遺伝子が導入された植物。
20. 種子である請求の範囲第19項に記載の植物。
21. 請求の範囲第19項又は第20項に記載の植物を生育して得られた果実。
22. 請求の範囲第1～7項のいずれかに記載のニコチアナミン合成酵素に対する抗体。
23. ポリクローナル抗体である請求の範囲第22項に記載の抗体。
24. モノクローナル抗体である請求の範囲第22項に記載の抗体。
25. 植物からニコチアナミン合成酵素を抽出する際に、チオールプロテアーゼ阻害剤の存在下に行うことを特徴とするニコチアナミン合成酵素を抽出する方法。
26. チオールプロテアーゼ阻害剤がE-64である請求の範囲第25項に記載の方法。

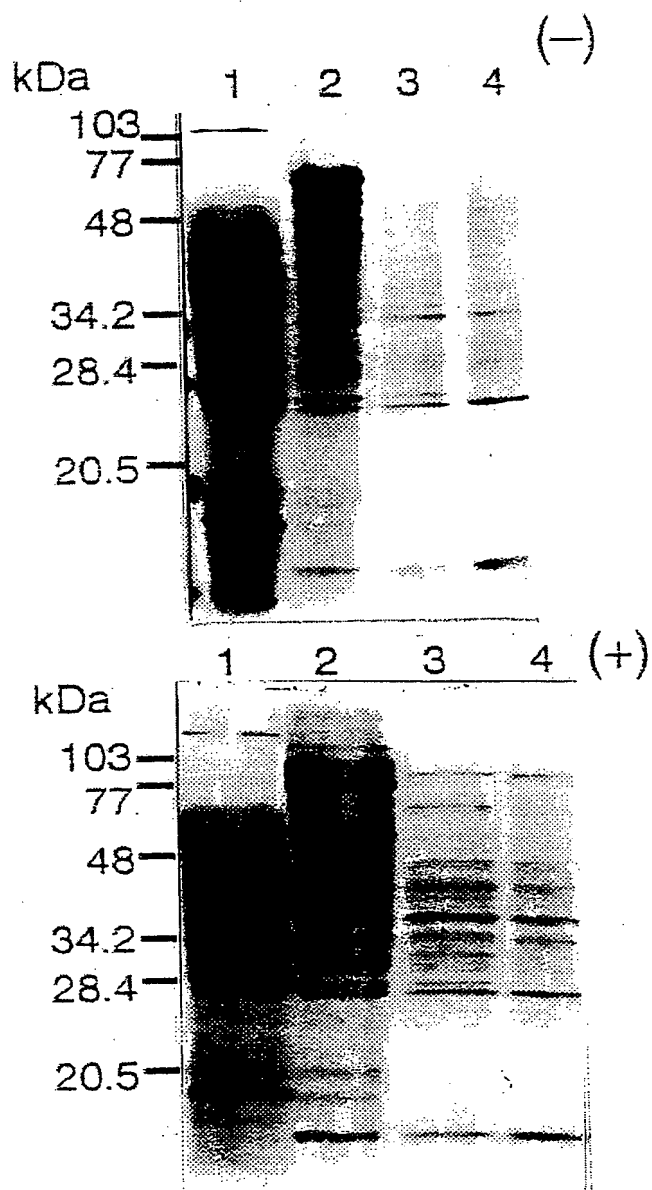


第 1 図



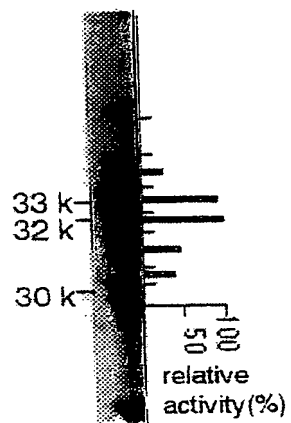


第 2 図



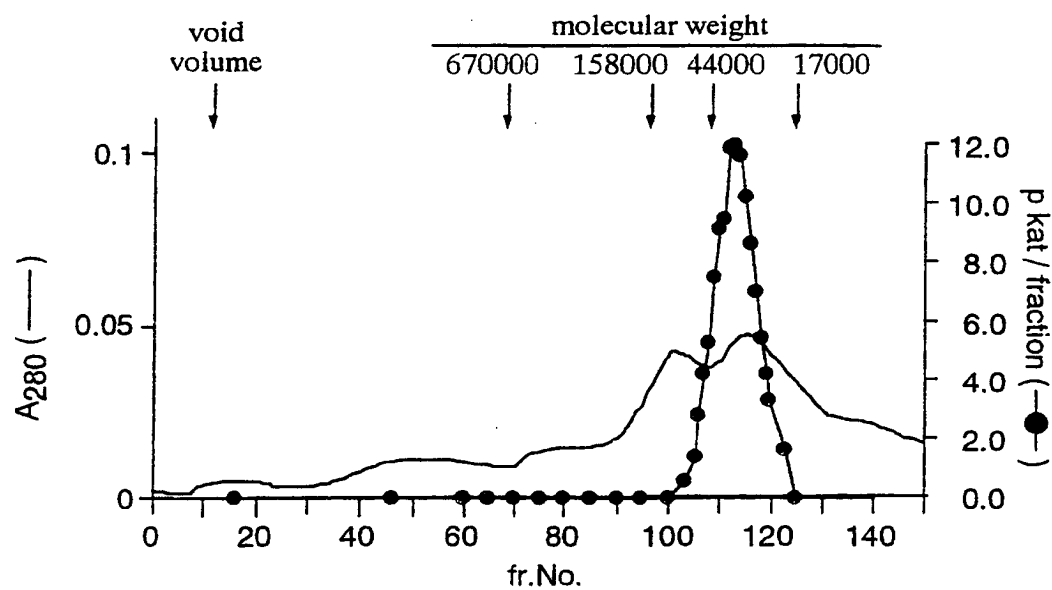


第 3 図



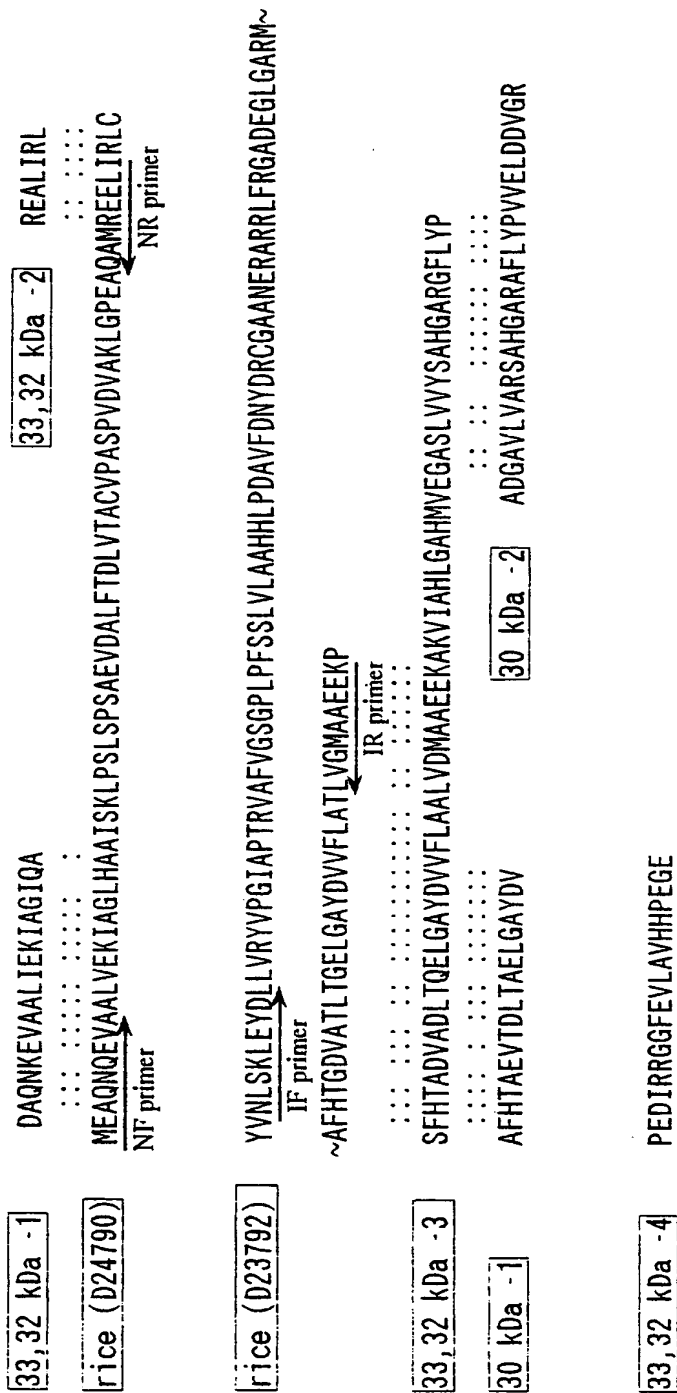


第 4 図





第 5 図





第 6 図

| | | |
|-----|--|--------------|
| | GCG TTC AGA GGC TTC CAG AGT TCT TCC GGT CAC CAA GAA GCA TTT GAT CAT AAC | 54 |
| 19 | ATG GAT GCC CAG AAC AAG GAG GTC GCT GCT CTG ATC GAG AAG ATC GCC GGT ATC M D A Q N K E V A A L I E K I A G I | 108 |
| 37 | CAG GCC GCC ATC GCC GAG CTG CCG TCG CTG AGC CCG TCC CCC GAG GTC GAC AGG Q A A I A E L P S L S P S P E V D R | 162 |
| 55 | CTC TTC ACC GAC CTC GTC ACG GCC TGC GTC CCG CCG AGC CCC GTC GAC GTG ACG L F T D L V T A C V P P S P V D V T | 216 |
| 73 | AAG CTC AGC CCG GAG CAC CAG AGG ATG CGG GAG GCT CTC ATC CGC TTG TGC TCC K L S P E H Q R M E A L I R L C S | 270 |
| 91 | GCC GCC GAG GGG AAG CTC GAG GCG CAC TAC GCC GAC CTG CTC GCC ACC TTC GAC A A E G K L E A H Y A D L L A T F D | 324 |
| 109 | AAC CCG CTC GAC CAC CTC GGC CTC TTC CCG TAC TAC AGC AAC TAC GTC AAC CTC N P L D H L G L F P Y Y S N Y V N L | 378 |
| 127 | AGC AGG CTG GAG TAC GAG CTC CTG GCG CGC CAC GTG CCG GGC ATC GCG CCG GCG S R L E Y E L L A R H V P G I A P A | 432 |
| 145 | CGC GTC GCC TTC GTC GGC TCC GGC CCG CTG CCG TTC AGC TCG CTC GTC CTC GCC R V A F V G S G P L P F S S L V L A | 486 |
| 163 | GCG CAC CAC CTG CCC GAG ACC CAG TTC GAC AAC TAC GAC CTG TGC GGC GCG GCC A H H L P E T Q F D N Y D L C G A A | 540 |
| 181 | AAC GAG CGC GCC AGG AAG CTG TTC GGC GCG ACG GCG GAC GGC GTC GGC GCG CGT N E R A R K L F G A T A D G V G A R | 594 |
| 199 | ATG TCG TTC CAC ACG GCG GAC GTC GCC GAC CTC ACC CAG GAG CTC GGC GCC TAC M S F H T A D V A D L T Q E L G A Y | 648 |
| 217 | GAC GTG GTC TTC CTC GCC GCG CTC GTC GGC ATG GCA GCC GAG GAG AAG GCC AAG D V V F L A A L V G M A A E E K A K | 702 |
| 235 | GTG ATT GCC CAC CTG GGC GCG CAC ATG GTG GAG GGG GCG TCC CTG GTC GTG CGG V I A H L G A H M V E G A S L V V R | 756 |
| 253 | AGC GCA CGG CCC CGC GGC TTT CTT TAC CCC ATT GTC GAC CCG GAG GAC ATC AGG S A R P R G F L Y P I V D P E D I R | 810 |
| 271 | CGG GGT GGG TTC GAG GTG CTG GCC GTG CAC CAC CCG GAA GGT GAG GTG ATC AAC R G G F E V L A V H H P E G E V I N | 864 |
| 289 | TCT GTC ATC GTC GCC CGT AAG GCC GTC GAA GCG CAG CTC AGT GGG CCG CAG AAC S V I V A R K A V E A Q L S G P Q N | 918 |
| 307 | GGA GAC GCG CAC GCA CGG GGC GCG GTG CCG TTG GTC AGC CCG CCA TGC AAC TTC G D A H A R G A V P L V S P P C N F | 972 |
| 325 | TCC ACC AAG ATG GAG GCG AGC GCG CTT GAG AAG AGC GAG GAG CTG ACC GCC AAA S T K M E A S A L E K S E E L T A K | 1026 |
| | GAG CTG GCC TTT TGA TTG AAG AGT GCG CGT GGT CAT TCT GTC GCC TGC GAT CGT E L A F * | 1080 |
| | GGT AAC TTT CCT ACT CGT GTG TGT TTT GAT GTT TGT GCC TGT AAG AGT TAT GCT TCC GGC CTT GTG CTG TTA ATT TAC ACG CGT TAC ATG TAG TAC TTG TAT TTA TAC | 1134 1188 |
| | CTG GAA TAA CGG TAT GTA ACA TAA ATA TTA GTG GGA TTT GAA GTG TAA TGC TAA ATA ATA AGA AAA CTT GAT GCA GAC ATT CAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA | 1242 |



第 7 図

HvNAS4 MDGQSE--EVDALVQKITGLHAAIAKLPSLSPSPDVALFTDLVTACVPPSPVDVTKLAP
 HvNAS7 MDAQSK--EVDALVQKITGLHAAIAKLPSLSPSPDVALFTDLVTACVPPSPVDVTKLAP
 HvNAS6 MDAQNK--EVDALVQKITGLHAAIAKLPSLSPSPDVALFTDLVTACVPPSPVDVTKLGS
 HvNAS2 MAAQNN-QEVDALVEKITGLHAAIAKLPSLSPSPDVALFTELVTACVPPSPVDVTKLGP
 HvNAS3 MAAQNNNKDVAALVEKITGLHAAIAKLPSLSPSPDVALFTELVTACVPPSPVDVTKLGP
 HvNAS1 MDAQNK--EVAALIEKIQAAIAELPSLSPSPEVDRLFTDLVTACVPPSPVDVTKLSP
 HvNAS5 MEAENG--EVAALVEKITGLHAAISKLPALSPSPQVDALFTELVAACVPSPVDVTKLGP
 * * ** ** * *** ** ***** ** *** ** ***** *****

HvNAS4 EAQAMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMDLAADFNDPLDHLGVFPYYSNYINLSKLEYELLAR
 HvNAS7 EAQAMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMDLAADFNDPLDHLGVFPYYSNYINLSKLEYELLAR
 HvNAS6 EAQEMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMDLAADFNDPLDHLGMFPYYSNYINLSKLEYELLAR
 HvNAS2 EAQEMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMDLAADFNDPLDHLGMFPYYSNYINLSKLEYELLAR
 HvNAS3 EAQEMREGLIRLCSEAEGKLEAHYSMDLAADFNDPLDHLGIFPYYSNYINLSKLEYELLAR
 HvNAS1 EHQRMRREALIRLCSAAEGKLEAHYADL LATFDNPLDHLGLFPYYSNYVNL SRLEYELLAR
 HvNAS5 EAQEMRQDLIRLCSAAEGLLEAHYSMDLTALDSPLDHLGRFPYFDNYVNL SKLEHDL LAG
 * * ** ***** *** ***** * * * ***** *** ** *** ** ***

HvNAS4 YVPGRRHPARVAFIGSGPLPFSSYVLAARHLPD TVFDNYDL CGAANDRATRLFRADKD-V
 HvNAS7 YVPGGIAPARVAFIGSGPLPFSSYVLAARHLPD TVFDNYVPVRAANDRATRLFRADKD-V
 HvNAS6 YVPGGIAPARVAFIGSGPLPFSSYVLAARHLPDAMFDNYDLCSAANDRASKLFRADKD-V
 HvNAS2 YVPGGYRPARVAFIGSGPLPFSSFVLAARHLPD TMFDNYDL CGAANDRASKLFRADRD-V
 HvNAS3 YVRR-HRPARVAFIGSGPLPFSSFVLAARHLPD TMFDNYDL CGAANDRASKLFRADTD-V
 HvNAS1 HVPG-IAPARVAFVGSGLPFSSVLAHHLPETQFDNYDL CGAANDRARKLFGATADGV
 HvNAS5 HVAA---PARVAFIGSGPLPFSSVLAHHLPDTRFDNYDRCSVANGRAMKLVGAADGV
 * *** ***** ** *** **** ** ** * * *

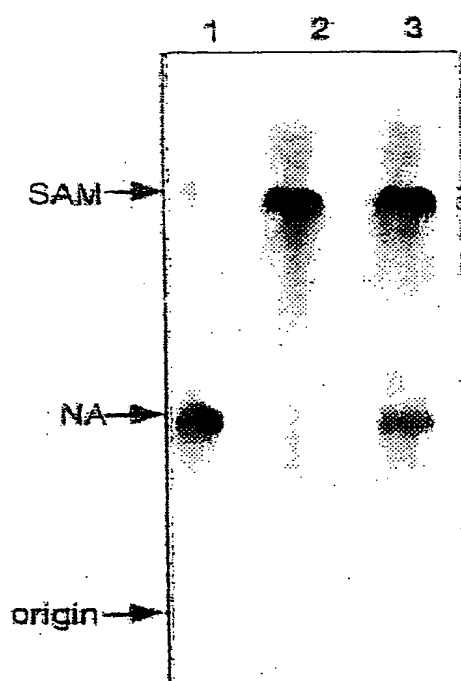
HvNAS4 GARMSFHTADVADLTDELATYDVVFLAALVGMAAEDKAKVIAHLGAHMADGAALV--ARH
 HvNAS7 GARMSFHTADVADLTDELATYDVVFLAALVGMAAEDKGGDPHLGAHMADGAALVR-SAH
 HvNAS6 GARMSFHTADVADLTRELAAYDVVFLAALVGMAAEDKAKVIPHLGAHMADGAALVV-RSA
 HvNAS2 GARMSFHTADVADLAGELAKYDVVFLAALVGMAAEDKAKVIAHLGAHMADGAALVVRSAH
 HvNAS3 GARMSFHTADVADLASELAKYDVVFLAALVGMAAEDKAKVIAHLGAHMADGAALVVRSAH
 HvNAS1 GARMSFHTADVADLTQELGAYDVVFLAALVGMAAEEKAKVIAHLGAHMVEGASLVV-RSA
 HvNAS5 RSRMAFHTAEVDTLTAE LGAYDVVFLAALVGMTSKEKADIAHLGKHMADGAVLVREALH
 ** **** * ** ** ***** * *** ** **

HvNAS4 GARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD-DDVNSVIAAQKSNVHEYGLGSGR--GGR
 HvNAS7 GARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD-DDVNSVIAAQSKDMFANGPRNGC--GGR
 HvNAS6 QARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD-DDVNSVIAHKS KD V HANERPNGR--GGQ
 HvNAS2 GARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD-DDVNSVIAAQSKDVHADGLSGRGAGGQ
 HvNAS3 GARGFLYPIVDPQDIGRGGFEVLAVCHPD-DDVNSVIAAQSKDEVHADGLSARGAGRQ
 HvNAS1 RPRGFLYPIVDPEDIRRGGEVLAVHHPE-GEVINSVIVARKAVEAQLSGPQNGD----A
 HvNAS5 GARAFLYPVVELDDVGRGGFQVLAVHHPAGDEVFNSFIVARKVKMSA-----
 * **** * * **** **** ** * ** * *

HvNAS4 YARGTVPVVSPPCRFG-EMVADVTQ--KREEFANAFAVAF
 HvNAS7 YARG-TVPVVSPPCRFG-EMVADVTQ--KREEFAKAEVAF
 HvNAS6 YRGA--VPVVSPPCRFG-EMVADVTQ--KREEFTNAFAVAF
 HvNAS2 YARG-TVPVVSPPCRFG-EMVADVTQNHKRDEFANAFAVAF
 HvNAS3 YARG-TVPVVSPPCRFG-EMVADVTQNHKRDEFANAFAVAF
 HvNAS1 HARG-AVPLVSPPCNFSTKMEASALE--KSEELTAKELAF
 ** ***** * * * * *

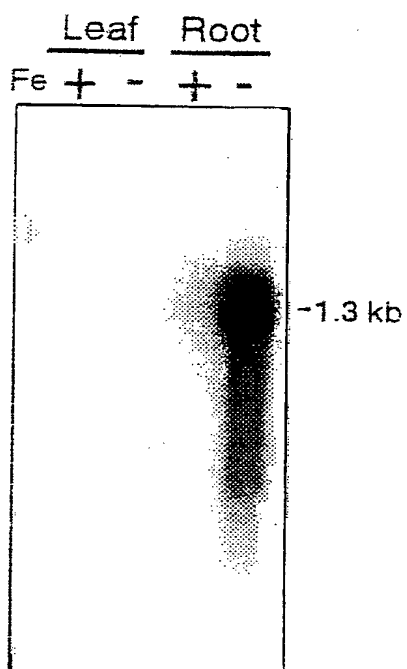


第 8 図



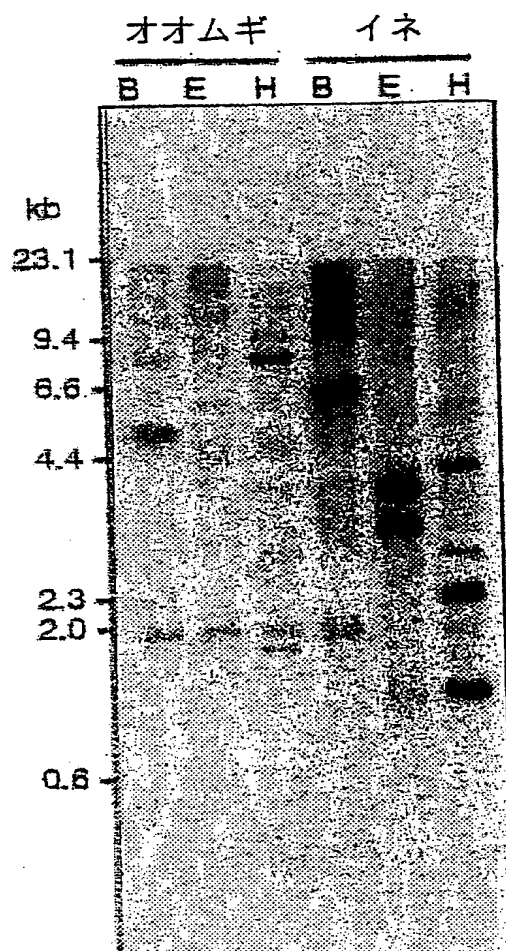


第 9 図

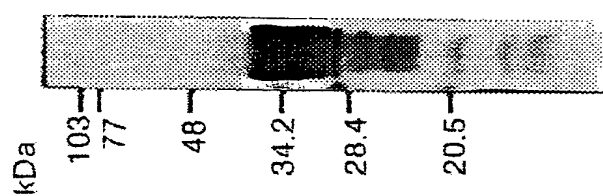




第 10 図

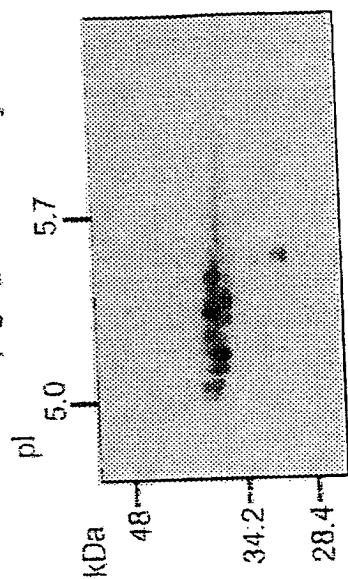




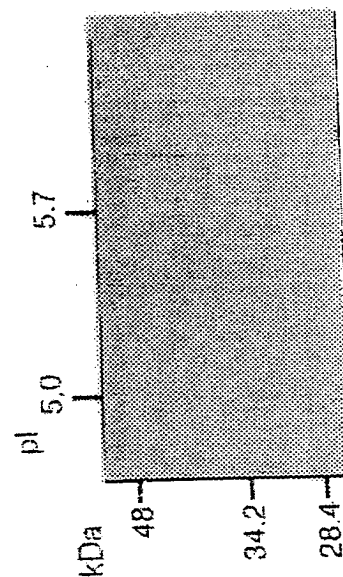




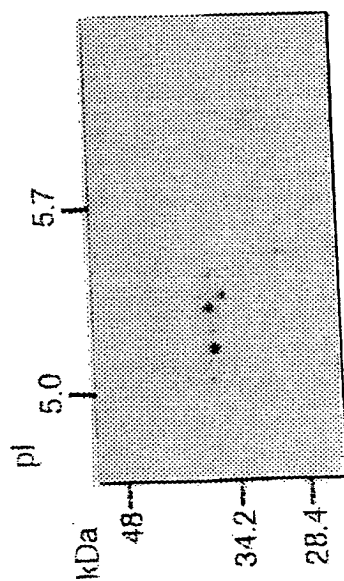
Fe-deficiency root



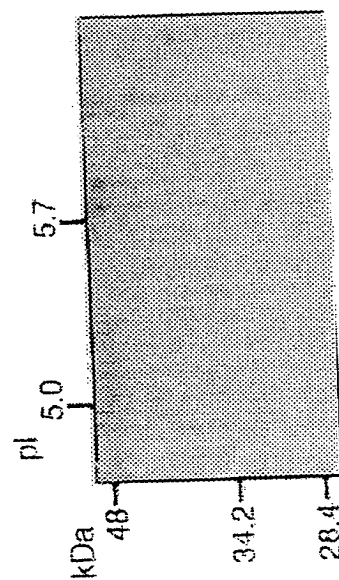
Fe-deficiency leaf



control root

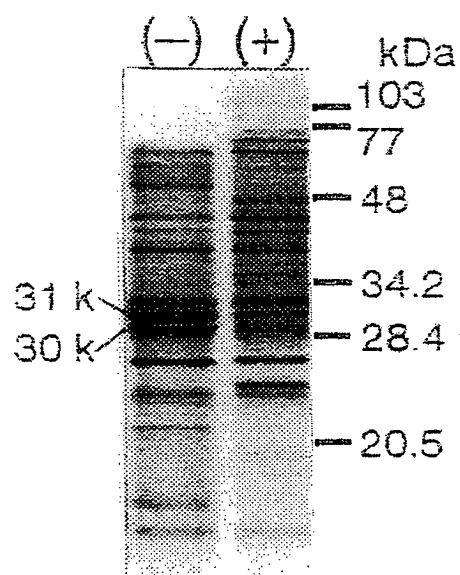


control leaf



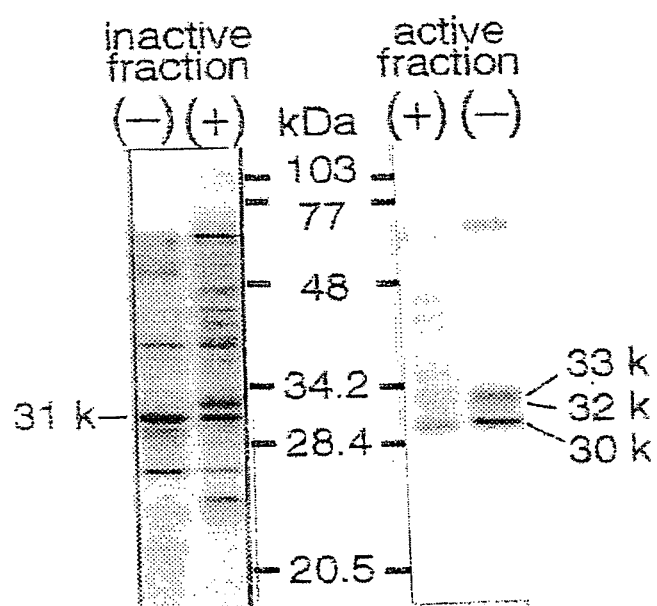


第 13 図



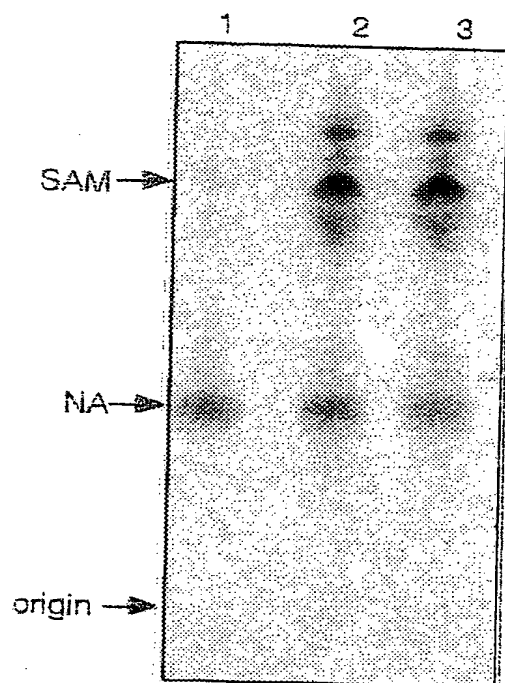


第 1 4 図

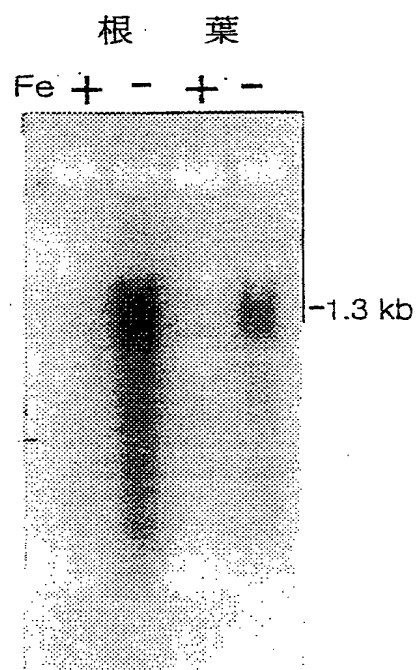




第 15 図

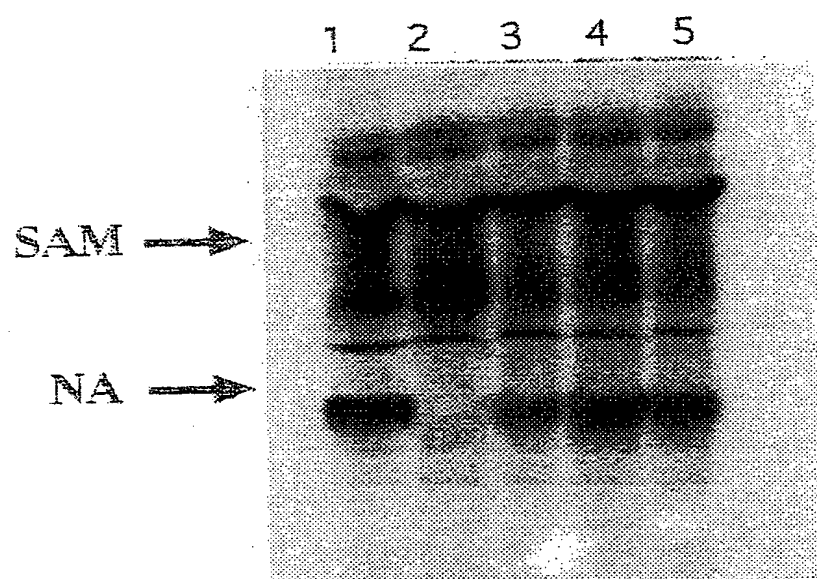






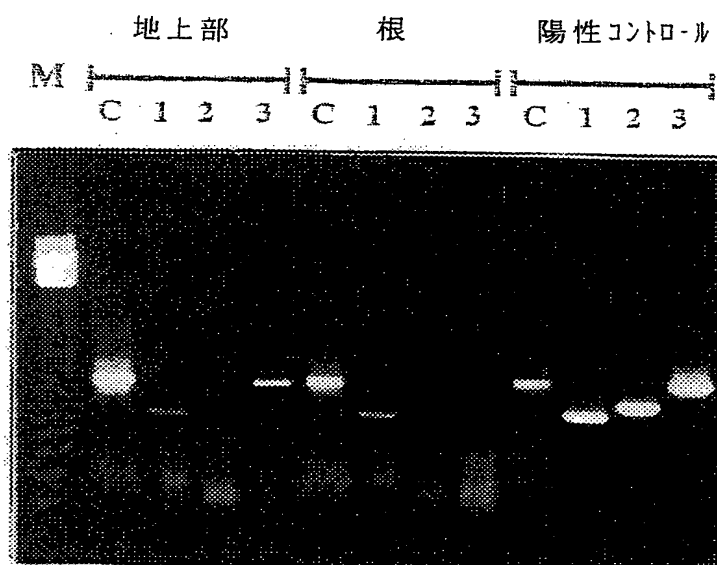


第 17 図





第 18 図





配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science And Technology Corporation

<120> Nicotianamine synthase, genes coding nicotianamine synthase

<130> PA906235

<160> 22

<210> 1

<211> 328

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 1

| | |
|---|-----|
| Met Asp Ala Gln Asn Lys Glu Val Ala Ala Leu Ile Glu Lys Ile | 15 |
| Ala Gly Ile Gln Ala Ala Ile Ala Glu Leu Pro Ser Leu Ser Pro | 30 |
| Ser Pro Glu Val Asp Arg Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys | 45 |
| Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ser Pro Glu His | 60 |
| Gln Arg Met Arg Glu Ala Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu | 75 |
| Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Thr Phe Asp | 90 |
| Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Leu Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr | 105 |
| Val Asn Leu Ser Arg Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg His Val | 120 |
| Pro Gly Ile Ala Pro Ala Arg Val Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro | 135 |
| Leu Pro Phe Ser Ser Leu Val Leu Ala Ala His His Leu Pro Glu | 150 |
| Thr Gln Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn Glu Arg | 165 |
| Ala Arg Lys Leu Phe Gly Ala Thr Ala Asp Gly Val Gly Ala Arg | 180 |
| Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Gln Glu Leu | 195 |



Gly Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala 210
 Ala Glu Glu Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met 225
 Val Glu Gly Ala Ser Leu Val Val Arg Ser Ala Arg Pro Arg Gly 240
 Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Glu Asp Ile Arg Arg Gly Gly 255
 Phe Glu Val Leu Ala Val His His Pro Glu Gly Glu Val Ile Asn 270
 Ser Val Ile Val Ala Arg Lys Ala Val Glu Ala Gln Leu Ser Gly 285
 Pro Gln Asn Gly Asp Ala His Ala Arg Gly Ala Val Pro Leu Val 300
 Ser Pro Pro Cys Asn Phe Ser Thr Lys Met Glu Ala Ser Ala Leu 315
 Glu Lys Ser Glu Glu Leu Thr Ala Lys Glu Leu Ala Phe 328

<210> 2

<211> 1295

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 2

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| GCGTTCAGAG GCTTCCAGAG TTCTTCCGGT CACCAAGAAG CATTGATCA TAACATGGAT | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| GCCCAGAACA AGGAGGTCGC TGCTCTGATC GAGAAGATCG CCGGTATCCA GGCCGCCATC | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| GCCGAGCTGC CGTCGCTGAG CCCGTCCCCC GAGGTCGACA GGCTCTTCAC CGACCTCGTC | | | | | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| ACGGCCTGCG TCCCGCCGAG CCCCGTCGAC GTGACGAAGC TCAGCCCGGA GCACCAGAGG | | | | | |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |



ATGCGGGAGG CTCTCATCCG CTTGTGCTCC GCCGCCGAGG GGAAGCTCGA GCGGCACTAC

310 320 330 340 350 360
GCCGACCTGC TCGCCACCTT CGACAACCCG CTCGACCACC TCGGCCTCTT CCCGTACTAC

370 380 390 400 410 420
AGCAACTACG TCAACCTCAG CAGGCTGGAG TACGAGCTCC TGGCGCGCCA CGTGCCGGGC

430 440 450 460 470 480
ATCGCGCCGG CGCGCGTCGC CTTGCTCGGC TCCGGCCCCG TGCCGTTTACG CTCGCTCGTC

490 500 510 520 530 540
CTCGCCGCGC ACCACCTGCC CGAGACCCAG TTCGACAACT ACGACCTGTG CGGCGCGGCC

550 560 570 580 590 600
AACGAGCGCG CCAGGAAGCT GTTCGGCGCG ACGGCGGACG GCGTCGGCGC GCGTATGTGC

610 620 630 640 650 660
TTCCACACGG CGGACGTCGC CGACCTCACC CAGGAGCTCG GCGCCTACGA CGTGGTCTTC

670 680 690 700 710 720
CTCGCCGCGC TCGTCGGCAT GGCAGCCGAG GAGAAGGCCA AGGTGATTGC CCACCTGGGC

730 740 750 760 770 780
GCGCACATGG TGGAGGGGGC GTCCCTGGTC GTGCGGAGCG CACGGCCCCG CGGCTTTCTT

790 800 810 820 830 840
TACCCCATTG TCGACCCGGA GGACATCAGG CGGGGTGGGT TCGAGGTGCT GGCCGTGCAC



850 860 870 880 890 900
CACCCGGAAG GTGAGGTGAT CAACTCTGTC ATCGTCGCCC GTAAGGCCGT CGAAGCGCAG

910 920 930 940 950 960
CTCAGTGGGC CGCAGAACGG AGACGCGCAC GCACGGGGCG CGGTGCCGTT GGTCAGCCCC

970 980 990 1000 1010 1020
CCATGCAACT TCTCCACCAA GATGGAGGCG AGCGCGCTTG AGAAGAGCGA GGAGCTGACC

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GCCAAAGAGC TGGCCTTTTG ATTGAAGAGT GCGCGTGGTC ATTCTGTCGC CTGCGATCGT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
GGTAACTTTC CTACTCGTGT GTGTTTGTAT GTTTGTGCCT GTAAGAGTTA TGCTTCCGGC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTTGTGCTGT TAATTTACAC GCGTTACATG TAGTACTTGT ATTTATACCT GGAATAACGG

1210 1220 1230 1240 1250 1260
TATGTAACAT AAATATTAGT GGGATTTGAA GTGTAATGCT AAATAATAAG AAAACTTGAT

1270 1280 1290 1300
GCAGACATTC AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAA

<210> 3

<211> 335

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare* L.



--
--

<400> 3

| | |
|---|-----|
| Met Ala Ala Gln Asn Asn Gln Glu Val Asp Ala Leu Val Glu Lys | 15 |
| Ile Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser | 30 |
| Pro Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Thr Ala | 45 |
| Cys Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro Glu | 60 |
| Ala Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala | 75 |
| Glu Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe | 90 |
| Asp Lys Pro Leu Asp His Leu Gly Met Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn | 105 |
| Tyr Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr | 120 |
| Val Pro Gly Gly Tyr Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser | 135 |
| Gly Pro Leu Pro Phe Ser Ser Phe Val Leu Ala Ala Arg His Leu | 150 |
| Pro Asp Thr Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn | 165 |
| Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Arg Asp Val Gly Ala | 180 |
| Arg Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Ala Gly Glu | 195 |
| Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met | 210 |
| Ala Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His | 225 |
| Met Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala His Gly Ala | 240 |
| Arg Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg | 255 |
| Gly Gly Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val | 270 |
| Val Asn Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Asp Val His Ala | 285 |
| Asp Gly Leu Gly Ser Gly Arg Gly Ala Gly Gly Gln Tyr Ala Arg | 300 |
| Gly Thr Val Pro Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met | 315 |
| Val Ala Asp Val Thr Gln Asn His Lys Arg Asp Glu Phe Ala Asn | 330 |
| Ala Glu Val Ala Phe | 335 |

<210> 4

<211> 1342



<212> DNA

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 4

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| CTCCTGTGCC TGTCTGAGG TACCAAGAAC ACCAGTGAAA TGGCTGCCCA GAACAACCAG | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| GAGGTGGATG CCCTGGTGGA GAAGATCACC GGGCTCCATG CCGCAATCGC CAAGCTGCCG | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| TCGCTCAGCC CATCCCCGGA CGTCGACGCG CTCTTCACGG AGCTGGTCAC GGCCTGCGTT | | | | | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| CCACCGAGTC CAGTGGACGT GACCAAGCTC GGGCCGGAGG CGCAGGAGAT GCGGGAGGGC | | | | | |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| CTCATCCGCC TATGCTCCGA GGCCGAGGGG AAGCTGGAGG CGCACTACTC CGACATGCTC | | | | | |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| GCCGCCTTCG ACAAGCCGCT GGATCACCTC GGCATGTTCC CCTACTACAA CAACTACATC | | | | | |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| AACCTCAGCA AGCTCGAGTA CGAGCTCCTG GCGCGCTACG TGCCTGGCGG CTATCGCCCC | | | | | |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| GCGCGCGTCG CGTTCATCGG CTCCGGCCCC CTGCCGTTCA GCTCCTTTGT CCTGGCCGCG | | | | | |
| 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |



CGCCACCTGC CCGACACCAT GTTCGACAAC TATGACCTGT GCGGTGCGGC CAACGATCGC

550 560 570 580 590 600
GCCAGCAAGC TCTTCGCGC GGATCGCGAC GTGGGTGCCC GCATGTCGTT CCACACGGCC

610 620 630 640 650 660
GACGTCGCGG ACCTCGCCGG CGAGCTCGCC AAGTACGACG TTGTCTTCCT GGCCGCACTC

670 680 690 700 710 720
GTCGGCATGG CCGCCGAGGA CAAGGCGAAG GTGATCGCGC ACCTCGGCGC ACACATGGCA

730 740 750 760 770 780
GACGGGGCGG CCCTCGTCGT GCGCAGCGCA CACGGAGCGC GCGGGTTCCT GTACCCGATC

790 800 810 820 830 840
GTCGACCCCC AGGACATCGG CCGAGGCGGG TTCGAGGTGC TGGCCGTGTG CCATCCCGAC

850 860 870 880 890 900
GACGACGTGG TGAACCTCGT CATCATCGCA CAGAAGTCCA AGGACGTGCA TGCCGATGGA

910 920 930 940 950 960
CTTGGCAGCG GCGGTGGTGC CGGTGGACAG TACGCGCGGG GCACGGTGCC TGTGTGTCAGC

970 980 990 1000 1010 1020
CCCCCGTGCA GGTTCCGGCA GATGGTGGCG GACGTGACCC AGAACCACAA GAGAGACGAG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TTTGCCAACG CCGAAGTGGC CTTTTGATCG TTCGCTGCGA GGGTGTGCAT CCATGATCCA



1090 1100 1110 1120 1130 1140
TCCATACCTC GTTCTGTGAT TGCATCAAGC TTGCAATCGT ATGCATTTCA AGTCACGTGT

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TGCTTCTATC CAATAATGTA CGTGTGGTGT TTACACGCGA ATGTCTTGTA GACCTTTGTA

1210 1220 1230 1240 1250 1260
TGTGTACAAG TGAATTTTAA TTCACAAGTA CATATAATGG TCACCATTGA AAAGATGTTT

1270 1280 1290 1300 1310 1320
AGTGTGTGTT TTCCAATATA TGTTTGTGTA AGGTTTCATCA TCTAATAAAA TATGTTTGGA

1330 1340 1350
ACCCAAAAAA AAAAAAAAAA AA

<210> 5

<211> 335

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 5

| | |
|---|-----|
| Met Ala Ala Gln Asn Asn Asn Lys Asp Val Ala Ala Leu Val Glu | 15 |
| Lys Ile Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu | 30 |
| Ser Pro Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Thr | 45 |
| Ala Cys Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro | 60 |
| Glu Ala Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu | 75 |
| Ala Glu Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala | 90 |
| Phe Asp Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Ile Phe Pro Tyr Tyr Ser | 105 |



| | |
|---|-----|
| Asn Tyr Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg | 120 |
| Tyr Val Arg Arg His Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser | 135 |
| Gly Pro Leu Pro Phe Ser Ser Phe Val Leu Ala Ala Arg His Leu | 150 |
| Pro Asp Thr Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn | 165 |
| Asp Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Thr Asp Val Gly Ala | 180 |
| Arg Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Ala Ser Glu | 195 |
| Leu Ala Lys Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met | 210 |
| Ala Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His | 225 |
| Met Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala His Gly Ala | 240 |
| Arg Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg | 255 |
| Gly Gly Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val | 270 |
| Val Asn Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Glu Val His Ala | 285 |
| Asp Gly Leu Gly Ser Ala Arg Gly Ala Gly Arg Gln Tyr Ala Arg | 300 |
| Gly Thr Val Pro Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met | 315 |
| Val Ala Asp Val Thr Gln Asn His Lys Arg Asp Glu Phe Ala Asn | 330 |
| Ala Glu Val Ala Phe | 335 |

<210> 6

<211> 1314

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 6

| | | | | | |
|---|----|----|-----|-----|-----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| CTACTTCACT CACACTAGTG CCCAGAAAGA AGGCTGCAAT GGCTGCCCAG AACAACAACA | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| AGGATGTGCG TGCCCTGGTG GAGAAGATCA CCGGGCTCCA CGCCGCCATC GCCAAGCTGC | | | | | |



| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| CGTCGCTCAG | CCCATCCCCG | GACGTCGACG | CGCTCTTCAC | CGAGCTGGTC | ACGGCGTGCG |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| TTCCCCCGAG | CCCCGTGGAC | GTGACCAAGC | TCGGCCCCGA | GGCGCAGGAG | ATGCGGGAGG |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| GCCTCATCCG | CCTCTGCTCC | GAGGCCGAGG | GGAAGCTGGA | GGCGCACTAC | TCCGACATGC |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| TCGCCGCCTT | CGACAACCCG | CTGGATCACC | TCGGCATCTT | CCCCTACTAC | AGCAACTACA |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| TCAACCTCAG | CAAGCTGGAG | TACGAGCTCC | TGGCACGCTA | CGTCCGGCGG | CATCGCCCCG |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| CCCGCGTCGC | GTTTCATCGG | TCCGGCCCCG | TGCCGTTTCA | CTCCTTTGTC | CTGGCCGCGC |
| 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| GCCACCTGCC | CGACACCATG | TTTGACAACT | ACGACCTTTG | CGGCGCGGCC | AACGATCGCG |
| 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| CCAGCAAGCT | CTTCGCGCG | GACACGGACG | TGGGTGCCCC | CATGTCGTTT | CACACGGCCG |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
| ACGTCGCGGA | CCTCGCCAGC | GAGCTCGCCA | AGTACGACGT | CGTCTTCCTG | GCCGCGCTCG |
| 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
| TCGGCATGGC | CGCCGAGGAC | AAGGCCAAGG | TGATCGCGCA | CCTCGGCGCA | CACATGGCAG |



730 740 750 760 770 780
ACGGGGCGGC CCTCGTCGTG CGCAGCGCAC ACGGAGCGCG CGGGTTCCTG TACCCGATTG

790 800 810 820 830 840
TCGACCCCCA GGACATCGGC CGCGGCGGGT TCGAGGTGCT GGCCGTGTGC CACCCCGACG

850 860 870 880 890 900
ACGACGTGGT GAACTCCGTC ATCATCGCAC AGAAGTCCAA GGAGGTGCAT GCCGATGGAC

910 920 930 940 950 960
TTGGCAGCGC GCGTGGTGCC GGTGACAGT ACGCGCGCGG CACGGTGCCG GTTGTACGCC

970 980 990 1000 1010 1020
CCCCGTGCAG GTTCGGTGAG ATGGTGGCGG ATGTGACCCA GAACCACAAG AGAGACGAGT

1030 1040 1050 1060 1070 1080
TTGCCAACGC CGAAGTGGCC TTTTGATCGA TCGTCGCCAA GGGACAATAA ATGAACGTGG

1090 1100 1110 1120 1130 1140
ATGTGGTAGG GTAATTTGCC TACCTCGCTG CTTGATCGCT TGCAATATGT GCACATTTTC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
CTACTACCGC TGCTTATGCA TTTCAAGCCA TGTGATGTTG GTATCCAATA AAGTATGTGT

1210 1220 1230 1240 1250 1260
AGGGTTTACA CGCAAATGTC TTTACACCTT GTACGTGTAA GTGTTGACAA CGATGAATTT

1270 1280 1290 1300 1310 1320



CAGTTCACAA TTAATAAATA GTATAATGGA TTCAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA

<210> 7

<211> 329

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 7

| | |
|---|-----|
| Met Asp Gly Gln Ser Glu Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile | 15 |
| Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro | 30 |
| Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys | 45 |
| Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ala Pro Glu Ala | 60 |
| Gln Ala Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu | 75 |
| Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp | 90 |
| Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Val Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr | 105 |
| Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val | 120 |
| Pro Gly Arg His Arg Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly | 135 |
| Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro | 150 |
| Asp Thr Val Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Gly Ala Ala Asn Asp | 165 |
| Arg Ala Thr Arg Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg | 180 |
| Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Asp Glu Leu | 195 |
| Ala Thr Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala | 210 |
| Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met | 225 |
| Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Ala Arg His Gly Ala Arg Gly Phe | 240 |
| Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly Phe | 255 |
| Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn Ser | 270 |
| Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Asn Asp Val His Glu Tyr Gly Leu | 285 |
| Gly Ser Gly Arg Gly Gly Arg Tyr Ala Arg Gly Thr Val Val Pro | 300 |



Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val 315
Thr Gln Lys Arg Glu Glu Phe Ala Asn Ala Glu Val Ala Phe 329

<210> 8

<211> 1249

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 8

| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| CCACTACCGA | CTACCGTAGT | ACCGTGCCTC | AGAGCTCATC | ACTGGTCAGG | TACCAAGAAG |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| ACATAAAAT | GGACGGCCAG | AGCGAGGAGG | TCGACGCCCT | TGTCCAGAAG | ATCACCGGCC |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| TCCACGCCGC | CATCGCCAAG | CTGCCCTCGC | TCAGCCCGTC | CCCGGACGTC | GACGCGCTCT |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| TCACCGACCT | GGTCACCGCG | TGCGTGCCCC | CGAGCCCCGT | GGACGTGACC | AAGCTCGCCC |
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| CGGAGGCGCA | GGCGATGCGG | GAGGGCCTCA | TCCGCCTCTG | CTCCGAGGCC | GAGGGCAAGC |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| TGGAGGCGCA | CTACTCCGAC | ATGCTCGCCG | CCTTCGACAA | CCCGCTCGAC | CACCTCGGCG |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| TCTTCCCCTA | CTACAGCAAC | TACATCAACC | TCAGCAAGCT | TGAGTACGAG | CTCCTCGCGC |



430 440 450 460 470 480
GCTACGTGCC CGGCAGGCAT CGCCCGGCC GCGTCGCCTT CATCGGCTCC GGCCCGCTGC

490 500 510 520 530 540
CGTTCAGCTC CTACGTCCTC GCCGCGCGCC ACCTGCCCGA CACCGTGTTT GACAACTACG

550 560 570 580 590 600
ACCTGTGCGG CGCGGCCAAC GACCGCGCGA CCAGGCTGTT CCGCGCGGAC AAGGACGTGC

610 620 630 640 650 660
GCGCCCGCAT GTCGTTCCAC ACCGCCGACG TCGCGGACCT CACCGACGAG CTCGCTACGT

670 680 690 700 710 720
ACGACGTGCT CTCCTGGCC GCGCTCGTGG GCATGGCCGC CGAGGACAAG GCCAAGGTGA

730 740 750 760 770 780
TCGCGCACCT TGGCGCGCAC ATGGCGGACG GGGCGGCCCT CGTTGCGCGG CACGGCGCGC

790 800 810 820 830 840
GTGGGTTTCT CTACCCGATC GTCGATCCCC AGGACATCGG TCGAGGCGGG TTCGAGGTGC

850 860 870 880 890 900
TCGCCGTGTG TCACCCCGAC GACGACGTGG TGAACCTCCGT CATCATCGCA CAAAAGAGCA

910 920 930 940 950 960
ACGACGTGCA CGAGTATGGA CTTGGCAGCG GCGGTGGTGG ACGGTACGCG CGAGGCACGG

970 980 990 1000 1010 1020



TGGTGCCGGT GGTGAGCCCA CCCTGCAGGT TCGGCGAGAT GGTGGCAGAC GTGACCCAGA

1030 1040 1050 1060 1070 1080
AGAGAGAGGA GTTTGCCAAC GCGGAAGTGG CCTTCTGATT GCTGCTGAAT CGCTTGTGAT

1090 1100 1110 1120 1130 1140
CGTACGTGGT AATTTTTCTA CTACTCCTCC TCCTACCACC ACCTATCACC TATGTATGCA

1150 1160 1170 1180 1190 1200
TTTCAAGTCG TGTGTTGTTT GTATCCAATA ATGTAAGTGA GATGTTTACA CGCGCAAAAA

1210 1220 1230 1240 1250
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

<210> 9

<211> 282

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 9

| | |
|---|-----|
| Met Glu Ala Glu Asn Gly Glu Val Ala Ala Leu Val Glu Lys Ile | 15 |
| Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ser Lys Leu Pro Ala Leu Ser Pro | 30 |
| Ser Pro Gln Val Asp Ala Leu Phe Thr Glu Leu Val Ala Ala Cys | 45 |
| Val Pro Ser Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Pro Glu Ala | 60 |
| Gln Glu Met Arg Gln Asp Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu | 75 |
| Gly Leu Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Thr Ala Leu Asp | 90 |
| Ser Pro Leu Asp His Leu Gly Arg Phe Pro Tyr Phe Asp Asn Tyr | 105 |
| Val Asn Leu Ser Lys Leu Glu His Asp Leu Leu Ala Gly His Val | 120 |



Ala Ala Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Leu Pro 135
 Phe Ser Ser Leu Phe Leu Ala Thr Tyr His Leu Pro Asp Thr Arg 150
 Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Cys Ser Val Ala Asn Gly Arg Ala Met 165
 Lys Leu Val Gly Ala Ala Asp Glu Gly Val Arg Ser Arg Met Ala 180
 Phe His Thr Ala Glu Val Thr Asp Leu Thr Ala Glu Leu Gly Ala 195
 Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Thr Ser Lys 210
 Glu Lys Ala Asp Ala Ile Ala His Leu Gly Lys His Met Ala Asp 225
 Gly Ala Val Leu Val Arg Glu Ala Leu His Gly Ala Arg Ala Phe 240
 Leu Tyr Pro Val Val Glu Leu Asp Asp Val Gly Arg Gly Gly Phe 255
 Gln Val Leu Ala Val His His Pro Ala Gly Asp Glu Val Phe Asn 270
 Ser Phe Ile Val Ala Arg Lys Val Lys Met Ser Ala 282

<210> 10

<211> 1044

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 10

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| GTGACATGGA GGCCGAAAAC GGCGAGGTGG CTGCTCTGGT CGAGAAGATC ACCGGTCTCC | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| ACGCCGCCAT CTCCAAGCTC CCGGCACTAA GCCCGTCTCC TCAAGTCGAC GCGCTCTTCA | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| CCGAGCTGGT TCGGGCGTGC GTCCCATCAA GCCCGGTGGA CGTGACCAAG CTCGGCCCGG | | | | | |
| 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| AGGCGCAGGA GATGCGGCAG GACCTCATCC GTCTCTGCTC GGCCGCCGAG GGGCTGCTCG | | | | | |



| | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|-----------------------|
| 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| AGGCGCACTA | CTCCGACATG | CTCACC | CGCGT | TGGACAGCCC | GCTCGACCAC CTCGGCCGCT |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| TCCCTTACTT | CGACA | ACTAC | GTCAACCTCA | GCAAGCTCGA | GCACGATCTT CTGGCAGGTC |
| 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 |
| ACGTGGCGGC | CCCGGCCCGC | GTGGCGTTCA | TCGGGTCGGG | GCCACTGCCG | TTCAGCTCGC |
| 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 |
| TCTTCCTTGC | GACGTACCAC | CTGCCGGACA | CCCGGTTCGA | CAACTACGAC | CGGTGCAGCG |
| 490 | 500 | 510 | 520 | 530 | 540 |
| TGGCGAATGG | CCGGGCGATG | AAGCTGGTCG | GCGCGGCGGA | CGAGGGCGTG | CGATCACGCA |
| 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| TGGCGTTCCA | CACGGCCGAA | GTCACGGACC | TCACGGCTGA | GCTCGGCGCT | TACGACGTGG |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 |
| TCTTCCTGGC | CGCGCTCGTG | GGAATGACGT | CCAAGGAGAA | GGCCGACGCC | ATAGCGCACT |
| 670 | 680 | 690 | 700 | 710 | 720 |
| TGGGGAAGCA | CATGGCAGAT | GGGGCGGTGC | TCGTGCGCGA | AGCGCTGCAC | GGGGCGCGAG |
| 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 |
| CGTTCCTGTA | TCCTGTCGTG | GAGCTGGACG | ATGTCGGGCG | TGGTGGGTTC | CAAGTGCTGG |
| 790 | 800 | 810 | 820 | 830 | 840 |



CCGTGCACCA CCCTGCAGGC GATGAGGTGT TCAACTCATT CATAGTTGCC CGGAAGGTGA

850 860 870 880 890 900
AAATGAGTGC TTAAATTAAG AAAAGGGTGA GCCTGTCTGC TTGTGCAAAT GGTGTCTCAC

910 920 930 940 950 960
ATTGATAATA ACCAGATGAT ACCCTGCACA TTGATGGGGG TACTGCAGTA TGTTC AATG

970 980 990 1000 1010 1020
AGGTCTGGTT GTATCAAATA TGAGTATTTG GCTTAATAAT ATCAGCGAAT ATGTTTCGAT

1030 1040 1050
TAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA

<210> 11

<211> 328

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 11

| | |
|---|-----|
| Met Asp Ala Gln Asn Lys Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile | 15 |
| Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro | 30 |
| Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys | 45 |
| Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Gly Ser Glu Ala | 60 |
| Gln Glu Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu | 75 |
| Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp | 90 |
| Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Met Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr | 105 |
| Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val | 120 |
| Pro Gly Gly Ile Ala Arg Pro Ala Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly | 135 |



Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro 150
 Asp Ala Met Phe Asp Asn Tyr Asp Leu Cys Ser Ala Ala Asn Asp 165
 Arg Ala Ser Lys Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg 180
 Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Arg Glu Leu 195
 Ala Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala 210
 Ala Glu Asp Lys Ala Lys Val Ile Pro His Leu Gly Ala His Met 225
 Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Ser Ala Gln Ala Arg Gly 240
 Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly 255
 Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn 270
 Ser Val Ile Ile Ala His Lys Ser Lys Asp Val His Ala Asn Glu 285
 Arg Pro Asn Gly Arg Gly Gly Gln Tyr Arg Gly Ala Val Pro Val 300
 Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val Thr 315
 His Lys Arg Glu Glu Phe Thr Asn Ala Glu Val Ala Phe 328

<210> 12

<211> 1352

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 12

| | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| CTCCACTTCG CTCCTGTGCC TCAGGTAGCC ACAACATACA GTATTAAAAT GGATGCCCAG | | | | | |
| 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| AACAAGGAGG TTGATGCCCT GGTCCAGAAG ATCACCGGCC TCCACGCCGC CATCGCCAAG | | | | | |
| 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| CTGCCGTCCC TCAGCCCATC ACCCGACGTC GACGCGCTCT TCACCGACCT GGTCACCGCG | | | | | |



190 200 210 220 230 240
TGC GTCCCC CGAGCCCCGT GGACGTGACC AAGCTCGGGT CGGAGGCGCA GGAGATGCGG

250 260 270 280 290 300
GAGGGCCTCA TCCGCCTCTG CTCCGAGGCC GAGGGGAAGC TGGAGGCGCA CTACTCCGAC

310 320 330 340 350 360
ATGCTGGCCG CCTTCGACAA CCCGCTCGAC CACCTCGGCA TGTCCCCTA CTACAGCAAC

370 380 390 400 410 420
TACATCAACC TCAGCAAGCT GGAGTACGAG CTCCTGGCGC GCTACGTGCC GGGCGGCATC

430 440 450 460 470 480
GCCCCGCCCG CTGTCGCGTT CATCGGCTCC GGCCCCGTGC CGTTCAGCTC CTACGTCCTC

490 500 510 520 530 540
GCCGCTCGCC ACCTGCCCGA CGCCATGTTC GACAACTACG ACCTGTGTAG CGCGGCCAAC

550 560 570 580 590 600
GACCGTGCGA GCAAGCTGTT CCGCGCGGAC AAGGACGTGG GCGCCCGCAT GTCTTTCCAC

610 620 630 640 650 660
ACCGCCGACG TAGCGGACCT CACCCGCGAG CTCGCCGCGT ACGACGTCGT CTCCTGGCC

670 680 690 700 710 720
GCGCTCGTGG GCATGGCTGC CGAGGACAAG GCCAAGGTGA TTCCGCACCT CGGCGCGCAC

730 740 750 760 770 780



ATGGCGGACG GGGCGGCCCT CGTCGTGCGC AGTGCGCAGG CACGTGGGTT CCTCTACCCG

790 800 810 820 830 840
ATCGTCGATC CCCAGGACAT CGGTCGAGGC GGGTTTGAGG TGCTGGCCGT GTGTCACCCC

850 860 870 880 890 900
GACGATGACG TGGTGAAC TC CGTCATCATC GCACACAAGT CCAAGGACGT GCATGCCAAT

910 920 930 940 950 960
GAACGTCCCA ACGGGCGTGG TGGACAGTAC CGGGGCGCGG TACCGGTGGT CAGCCCGCCG

970 980 990 1000 1010 1020
TGCAGGTTCG GTGAGATGGT GCGGGACGTG ACCCACAAGA GAGAGGAGTT CACCAACGCG

1030 1040 1050 1060 1070 1080
GAAGTGGCCT TCTGATCGTT GCGAGGGAAT GAAAATGAAG GTGGACGTGT GTGGTCAGCA

1090 1100 1110 1120 1130 1140
TCCATACGTG GCTGCCTGCT TCATCGCTTG CAATCGTACT ACTACCTACC TATGCAGTTC

1150 1160 1170 1180 1190 1200
AAGTCATGTG TTGTCAATGT AAGTGTGATG TTTACACTAG TCTATGAAAG GCAGGGCAGA

1210 1220 1230 1240 1250 1260
CGAGGGTAGT GTGCCAAGTA ACAGTGTGTC ATTATAGGTG TAAGTGTGTA GAATAAGACC

1270 1280 1290 1300 1310 1320
ATTTTGTTC ACAAATAGTA TGATGTAATC GGTGTCATAT TCGTATTGAG TACATTTGTC



--

--

1330 1340 1350 1360

AAGTTGGTTG CTAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA

<210> 13

<211> 329

<212> PRT

<213> *Hordeum vulgare* L.

<400> 13

| | |
|---|-----|
| Met Asp Ala Gln Ser Lys Glu Val Asp Ala Leu Val Gln Lys Ile | 15 |
| Thr Gly Leu His Ala Ala Ile Ala Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro | 30 |
| Ser Pro Asp Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys | 45 |
| Val Pro Pro Ser Pro Val Asp Val Thr Lys Leu Ala Pro Glu Ala | 60 |
| Gln Ala Met Arg Glu Gly Leu Ile Arg Leu Cys Ser Glu Ala Glu | 75 |
| Gly Lys Leu Glu Ala His Tyr Ser Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp | 90 |
| Asn Pro Leu Asp His Leu Gly Val Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn Tyr | 105 |
| Ile Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Glu Leu Leu Ala Arg Tyr Val | 120 |
| Pro Gly Gly Ile Ala Pro Ala Arg Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly | 135 |
| Pro Leu Pro Phe Ser Ser Tyr Val Leu Ala Ala Arg His Leu Pro | 150 |
| Asp Thr Val Phe Asp Asn Tyr Val Pro Val Arg Ala Ala Asn Asp | 165 |
| Arg Ala Thr Arg Leu Phe Arg Ala Asp Lys Asp Val Gly Ala Arg | 180 |
| Met Ser Phe His Thr Ala Asp Val Ala Asp Leu Thr Asp Glu Leu | 195 |
| Ala Thr Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala | 210 |
| Ala Glu Asp Lys Gly Gln Gly Asp Pro His Leu Gly Ala His Met | 225 |
| Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Arg Ser Ala His Gly Ala Arg Gly | 240 |
| Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Gln Asp Ile Gly Arg Gly Gly | 255 |
| Phe Glu Val Leu Ala Val Cys His Pro Asp Asp Asp Val Val Asn | 270 |
| Ser Val Ile Ile Ala Gln Lys Ser Lys Asp Met Phe Ala Asn Gly | 285 |



| | |
|---|-----|
| Pro Arg Asn Gly Cys Gly Gly Arg Tyr Ala Arg Gly Thr Val Pro | 300 |
| Val Val Ser Pro Pro Cys Arg Phe Gly Glu Met Val Ala Asp Val | 315 |
| Thr Gln Lys Arg Glu Glu Phe Ala Lys Ala Glu Val Ala Phe | 329 |

<210> 14

<211> 1371

<212> DNA

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 14

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| GGAGCGGNAC | GCGTGGCGGA | GGTGGGCACT | ACCGTAGTAC | CGTGCCTCAG |
| 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| AGCTCATCAC | TGGTCAGGTA | CCAAGAAGAC | ATAAAAATGG | ACGCCCAGAG |
| 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| CAAGGAGGTC | GACGCCCTTG | TCCAGAAGAT | CACCGGCCTC | CACGCCGCCA |
| 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |
| TCGCCAAGCT | GCCCTCGCTC | AGCCCGTCCC | CGGACGTCGA | CGCGCTCTTC |
| 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| ACCGACCTGG | TCACCGCGTG | CGTGCCCCCG | AGCCCCGTGG | ACGTGACCAA |
| 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| GCTCGCCCCG | GAGGCGCAGG | CGATGCGGGA | GGGCCTCATC | CGCCTCTGCT |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
| CCGAGGCCGA | GGGCAAGCTG | GAGGCGCACT | ACTCCGACAT | GCTCGCCGCC |
| 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| TTCGACAACC | CGCTCGACCA | CCTCGGCGTC | TTCCCCTACT | ACAGCAACTA |
| 410 | 420 | 430 | 440 | 450 |



| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|-------------|
| CATCAACCTC | AGCAAGCTCG | AGTACGAGCT | CCTCGCGCGC | TACGTGCCCCG |
| 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |
| GCGGCATCGC | CCCGGCCCGC | GTCGCCTTCA | TCGGCTCCGG | CCCGCTCCCG |
| 510 | 520 | 530 | 540 | 550 |
| TTCAGCTCCT | ACGTCCTCGC | CGCGCGCCAC | CTGCCCCACA | CCGTGTTCGA |
| 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| CAACTACGTA | CCTGTGCGCG | CGGCCAACGA | CCGCGCGACC | AGGCTGTTCC |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 |
| GCGCGGACAA | GGACGTGCGC | GCCCGCATGT | CGTTCCACAC | CGCCGACGTC |
| 660 | 670 | 680 | 690 | 700 |
| GCGGACCTCA | CCGACGAGCT | CGCTACGTAC | GACGTCGTCT | TCCTGGCCGC |
| 710 | 720 | 730 | 740 | 750 |
| GCTCGTGGGC | ATGGCCGCCG | AGGACAAGGG | CCAAGGTGAT | CCGCACCTTG |
| 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |
| GCGCGCACAT | GGCGGACGGG | GCGGCCCTCG | TCCGCAGCGC | GCACGGGGCG |
| 810 | 820 | 830 | 840 | 850 |
| CGTGGGTTCC | TCTACCCGAT | CGTCGATCCC | CAAGACATTG | GTCGAGGCGG |
| 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |
| GTTCGAGGTG | CTCGCCGTGT | GTCACCCCGA | CGACGACGTG | GTGAACTCCG |
| 910 | 920 | 930 | 940 | 950 |
| TCATCATCGC | GCAGAAGTCT | AAGGACATGT | TTGCCAATGG | ACCTCGCAAC |
| 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 |
| GGGTGTGGTG | GACGGTACGC | GCGAGGCACG | GTGCCGGTGG | TCAGCCCGCC |
| 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 |
| CTGCAGGTTC | GGCGAGATGG | TGGCAGACGT | GACCCAGAAG | AGAGAGGAGT |
| 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 |
| TTGCCAAGGC | GGAAGTGGCC | TTCTGATTGC | TGCGAGGTCA | CCATCCGTAT |
| 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 |
| GCCGCTGCTA | CCTTTCAATA | TCTTGCAATC | GTAGGTGGCG | ATTTTCCTAC |



| | | | | |
|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| TCTTGTTACG | ACCTTTCAAA | TCATATGTTG | TTTGTACCCA | ATAATGTAAG |
| 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 |
| TGTGTTGCTT | ACACGCGCAT | GTCTTGTAACA | CTCGGTCTCT | AGAAGGCAGG |
| 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 |
| GCAGATCAAG | AGACTGTGCA | AAGGAAAAGA | AATGTGTGTT | GTTGTAGGTG |
| 1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 |
| TATGAGTTGG | GAGTAAGATG | ATTCTAGTTC | ACAAAAAAAA | AAAAAAAAAA |
| 1360 | 1370 | 1380 | | |
| AAAAAAAAAA | AAAAAAAAAA | A | | |

<210> 15

<211> 332

<212> PRT

<213> *Oryza sativa* L.

<400> 15

| | |
|---|-----|
| Met Glu Ala Gln Asn Gln Glu Val Ala Ala Leu Val Glu Lys Ile | 15 |
| Ala Gly Leu His Ala Ala Ile Ser Lys Leu Pro Ser Leu Ser Pro | 30 |
| Ser Ala Glu Val Asp Ala Leu Phe Thr Asp Leu Val Thr Ala Cys | 45 |
| Val Pro Ala Ser Pro Val Asp Val Ala Lys Leu Gly Pro Glu Ala | 60 |
| Gln Ala Met Arg Glu Glu Leu Ile Arg Leu Cys Ser Ala Ala Glu | 75 |
| Gly His Leu Glu Ala His Tyr Ala Asp Met Leu Ala Ala Phe Asp | 90 |
| Asn Pro Leu Asp His Leu Ala Arg Phe Pro Tyr Tyr Gly Asn Tyr | 105 |
| Val Asn Leu Ser Lys Leu Glu Tyr Asp Leu Leu Val Arg Tyr Val | 120 |
| Pro Gly Ile Ala Pro Thr Arg Val Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro | 135 |
| Leu Pro Phe Ser Ser Leu Val Leu Ala Ala His His Leu Pro Asp | 150 |



--
--

| | |
|---|-----|
| Ala Val Phe Asp Asn Tyr Asp Arg Cys Gly Ala Ala Asn Glu Arg | 165 |
| Ala Arg Arg Leu Phe Arg Gly Ala Asp Glu Gly Leu Gly Ala Arg | 180 |
| Met Ala Phe His Thr Ala Asp Val Ala Thr Leu Thr Gly Glu Leu | 195 |
| Gly Ala Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Ala | 210 |
| Ala Glu Glu Lys Ala Gly Val Ile Ala His Leu Gly Ala His Met | 225 |
| Ala Asp Gly Ala Ala Leu Val Val Arg Thr Ala His Gly Ala Arg | 240 |
| Gly Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Pro Glu Asp Val Arg Arg Gly | 255 |
| Gly Phe Asp Val Leu Ala Val Cys His Pro Glu Asp Glu Val Ile | 270 |
| Asn Ser Val Ile Val Ala Arg Lys Val Gly Ala Ala Ala Ala Ala | 285 |
| Ala Ala Ala Arg Arg Asp Glu Leu Ala Asp Ser Arg Gly Val Val | 300 |
| Leu Pro Val Val Gly Pro Pro Ser Thr Cys Cys Lys Val Glu Ala | 315 |
| Ser Ala Val Glu Lys Ala Glu Glu Phe Ala Ala Asn Lys Glu Leu | 330 |
| Ser Val* | 345 |

<210> 16

<211> 1372

<212> DNA

<213> *Oryza sativa* L.

<400> 16

| | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| CTCCATTTGG | TTGTCATTTT | CAACTATAAT | CCACCACAAC | TCGTGCAACA |
| 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| TCAGCTCACT | CGTGTTCCCA | ACCGCGACAA | AGCTTCACAG | ATGGAGGCTC |
| 110 | 120 | 130 | 140 | 150 |
| AGAACCAAGA | GGTCGCTGCC | CTGGTCGAGA | AGATCGCCGG | CCTCCACGCC |
| 160 | 170 | 180 | 190 | 200 |



| | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|-------------|
| GCCATCTCCA | AGCTGCCGTC | GCTGAGCCCA | TCCGCCGAGG | TGGACGCGCT |
| 210 | 220 | 230 | 240 | 250 |
| CTTCACCGAC | CTCGTCACGG | CGTGCGTCCC | GGCGAGCCCC | GTCGACGTGG |
| 260 | 270 | 280 | 290 | 300 |
| CCAAGCTCGG | CCCGGAGGCG | CAGGCGATGC | GGGAGGAGCT | CATCCGCCTC |
| 310 | 320 | 330 | 340 | 350 |
| TGCTCCGCCG | CCGAGGGCCA | CCTCGAGGCG | CACTACGCCG | ACATGCTCGC |
| 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| CGCCTTCGAC | AACCCGCTCG | ACCACCTCGC | CCGCTTCCCG | TACTACGGCA |
| 410 | 420 | 430 | 440 | 450 |
| ACTACGTCAA | CCTGAGCAAG | CTGGAGTACG | ACCTCCTCGT | CCGCTACGTC |
| 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |
| CCCGGCATTG | CCCCCACC CG | CGTCGCCTTC | GTCGGGTCGG | GCCCGCTGCC |
| 510 | 520 | 530 | 540 | 550 |
| GTTCAGCTCC | CTCGTGCTCG | CTGCGCACCA | CCTGCCGGAC | GCGGTGTTTCG |
| 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |
| ACA ACTACGA | CCGGTGCGGC | GCGGCCAACG | AGCGGGCGAG | GAGGCTGTTC |
| 610 | 620 | 630 | 640 | 650 |
| CGCGGCGCCG | ACGAGGGCCT | CGGCGCGCGC | ATGGCGTTCC | ACACCGCCGA |
| 660 | 670 | 680 | 690 | 700 |
| CGTGGCGACC | CTGACGGGGG | AGCTCGGCGC | GTACGACGTC | GTGTTCTCTGG |
| 710 | 720 | 730 | 740 | 750 |
| CGGCGCTCGT | GGGCATGGCG | GCCGAGGAGA | AGGCCGGGGT | GATCGCGCAC |
| 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |
| CTGGGCGCGC | ACATGGCGGA | CGGCGCGGCG | CTCGTCGTGC | GGACGGCGCA |
| 810 | 820 | 830 | 840 | 850 |
| CGGGGCGCGC | GGGTTCTCTG | ACCCGATCGT | CGATCCCGAG | GACGTCAGGC |
| 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |
| GTGGCGGGTT | CGACGTTCTG | GCGGTGTGCC | ACCCGGAGGA | CGAGGTGATC |



| | | | | |
|------------|-------------|------------|------------|-------------|
| 910 | 920 | 930 | 940 | 950 |
| AACTCCGTCA | TCGTCGCCCCG | CAAGGTCGGT | GCCGCCGCCG | CCGCCGCCGC |
| 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 |
| GGCGCGCAGA | GACGAGCTCG | CGGACTCGCG | CGGCGTGGTT | CTGCCGGTGG |
| 1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 |
| TCGGGCCGCC | GTCCACGTGC | TGCAAGGTGG | AGGCGAGCGC | GGTTGAGAAG |
| 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 |
| GCAGAAGAGT | TTGCCGCCAA | CAAGGAGCTG | TCCGTCTAAC | AGCCGGACGA |
| 1110 | 1120 | 1130 | 1140 | 1150 |
| TCGAAAGGCG | CACTATATTA | TGGCAATAAA | TCATTTGATT | ATACTTATGC |
| 1160 | 1170 | 1180 | 1190 | 1200 |
| TGCATTTGCG | AAGCTAAGGT | ATACTATGCA | AGCCATATGT | TTGTGTTTCGT |
| 1210 | 1220 | 1230 | 1240 | 1250 |
| ACGTGTTGTT | TGGGACGTAC | AGTTGTGTTG | TTGTACGTCG | TGAAGTACTG |
| 1260 | 1270 | 1280 | 1290 | 1300 |
| AAGTGTTTAC | AGTAGATCAC | AAGTTCACAG | CAATCAATGA | GGACCCTGTA |
| 1310 | 1320 | 1330 | 1340 | 1350 |
| AGCCAGTGTA | AACGAGGAAC | ATGCCATCTG | TGTATGACAG | TGAGAAATTA |
| 1360 | 1370 | 1380 | | |
| TATAAGAAAA | ACATTTTGTG | AC | | |

<210> 17

<211> 320

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 17

Met Ala Cys Gln Asn Asn Leu Val Val Lys Gln Ile Ile Asp Leu

15



| | |
|---|-----|
| Tyr Asp Gln Ile Ser Lys Leu Lys Ser Leu Lys Pro Ser Lys Asn | 30 |
| Val Asp Thr Leu Phe Gly Gln Leu Val Ser Thr Cys Leu Pro Thr | 45 |
| Asp Thr Asn Ile Asp Val Thr Asn Met Cys Glu Glu Val Lys Asp | 60 |
| Met Arg Ala Asn Leu Ile Lys Leu Cys Gly Glu Ala Glu Gly Tyr | 75 |
| Leu Glu Gln His Phe Ser Thr Ile Leu Gly Ser Leu Gln Glu Asp | 90 |
| Gln Asn Pro Leu Asp His Leu His Ile Phe Pro Tyr Tyr Ser Asn | 105 |
| Tyr Leu Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Ser Gln His | 120 |
| Ser Ser His Val Pro Thr Lys Ile Ala Phe Val Gly Ser Gly Pro | 135 |
| Met Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Lys Phe His Leu Pro Asn | 150 |
| Thr Thr Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Ser His Ala Asn Thr Leu | 165 |
| Ala Ser Asn Leu Val Ser Arg Asp Pro Asp Leu Ser Lys Arg Met | 180 |
| Ile Phe His Thr Thr Asp Val Leu Asn Ala Thr Glu Ala Leu Asp | 195 |
| Gln Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asp Lys | 210 |
| Glu Ser Lys Val Lys Ala Ile Glu His Leu Glu Lys His Met Ala | 225 |
| Pro Gly Ala Val Leu Met Leu Arg Arg Ala His Ala Leu Arg Ala | 240 |
| Phe Leu Tyr Pro Ile Val Asp Ser Ser Asp Leu Lys Gly Phe Gln | 255 |
| Leu Leu Thr Ile Tyr His Pro Thr Asp Asp Val Val Asn Ser Val | 270 |
| Val Ile Ala Arg Lys Leu Gly Gly Pro Thr Thr Pro Gly Val Asn | 285 |
| Gly Thr Arg Gly Cys Met Phe Met Pro Cys Asn Cys Ser Lys Ile | 300 |
| His Ala Ile Met Asn Asn Arg Gly Lys Lys Asn Met Ile Glu Glu | 315 |
| Phe Ser Thr Ile Glu | 320 |

<210> 18

<211> 963

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 18

| | |
|--|----|
| ATGGCTTGCC AAAACAATCT CGTTGTGAAG CAAATCATCG ACTTGACGA CCAAATCTCA | 60 |
|--|----|



| | |
|--|-----|
| AAGCTCAAGA GCTTAAACCC TTCCAAAAAT GTCGACACTT TGTTCGGACA ACTCGTGTCC | 120 |
| ACGTGCTTAC CCACGGATAC AAACATCGAT GTCACAAATA TGTGTGAAGA AGTCAAAGAC | 180 |
| ATGAGAGCTA ATCTCATCAA GCTTTGTGGT GAAGCCGAAG GTTATTTGGA GCAACACTTC | 240 |
| TCCACAATTT TGGGATCTTT ACAAGAAGAC CAAAACCCAC TTGACCATTT ACACATCTTT | 300 |
| CCTTACTACT CCAACTACCT CAAGCTAGGC AAGCTCGAGT TCGATCTCCT GAGCCAACAC | 360 |
| TCAAGCCATG TCCCCACCAA GATTGCCTTC GTGGGTTTCGG GTCCGATGCC TCTCACATCC | 420 |
| ATCGTATTGG CCAAGTTTCA CCTCCCCAAC ACGACGTTCC ACAACTTTGA CATCGACTCA | 480 |
| CACGCAAACA CACTCGCTTC AAACCTCGTC TCTCGCGACC CGGACCTCTC AAAACGCATG | 540 |
| ATCTTCCACA CAACGGACGT ACTAAACGCA ACCGAAGCCC TTGACCAATA TGACGTCGTT | 600 |
| TTCTTAGCGG CGCTTGTAGG GATGGACAAA GAGTCAAAGG TCAAAGCCAT CGAGCACTTG | 660 |
| GAGAAACACA TGGCTCCTGG AGCTGTTCTT ATGCTAAGGA GGGCTCATGC TCTCAGAGCT | 720 |
| TTCTTATATC CAATCGTTGA CTCGTCTGAT CTCAAAGGCT TTCAACTCTT GACCATCTAT | 780 |
| CATCCAACCG ATGACGTGGT TAACTCGGTT GTGATCGCAC GTAAGCTCGG TGGTCCGACC | 840 |
| ACGCCCCGGG TTAATGGTAC TCGTGGATGC ATGTTTATGC CTTGTAAGT CTCCAAGATT | 900 |
| CACGCGATCA TGAACAACCG TGGTAAGAAG AATATGATCG AGGAGTTTAG TACCATCGAG | 960 |
| TAA | 963 |

<210> 19

<211> 320

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 19

| | |
|---|----|
| Met Ala Cys Gln Asn Asn Leu Val Val Lys Gln Ile Met Asp Leu | 15 |
| Tyr Asn Gln Ile Ser Asn Leu Glu Ser Leu Lys Pro Ser Lys Asn | 30 |
| Val Asp Thr Leu Phe Arg Gln Leu Val Ser Thr Cys Leu Pro Thr | 45 |
| Asp Thr Asn Ile Asp Val Thr Glu Ile His Asp Glu Lys Val Lys | 60 |
| Asp Met Arg Ser His Leu Ile Lys Leu Cys Gly Glu Ala Glu Gly | 75 |
| Tyr Leu Glu Gln His Phe Ser Ala Ile Leu Gly Ser Phe Glu Asp | 90 |



| | |
|---|-----|
| Asn Pro Leu Asn His Leu His Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn Tyr | 105 |
| Leu Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Ser Gln His Thr | 120 |
| Thr His Val Pro Thr Lys Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Met | 135 |
| Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Lys Phe His Leu Pro Asn Thr | 150 |
| Thr Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Ser His Ala Asn Thr Leu Ala | 165 |
| Ser Asn Leu Val Ser Arg Asp Ser Asp Leu Ser Lys Arg Met Ile | 180 |
| Phe His Thr Thr Asp Val Leu Asn Ala Lys Glu Gly Leu Asp Gln | 195 |
| Tyr Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asp Lys Glu | 210 |
| Ser Lys Val Lys Ala Ile Glu His Leu Glu Lys His Met Ala Pro | 225 |
| Gly Ala Val Val Met Leu Arg Ser Ala His Gly Leu Arg Ala Phe | 240 |
| Leu Tyr Pro Ile Val Asp Ser Cys Asp Leu Lys Gly Phe Glu Val | 255 |
| Leu Thr Ile Tyr His Pro Ser Asp Asp Val Val Asn Ser Val Val | 270 |
| Ile Ala Arg Lys Leu Gly Gly Ser Asn Gly Ala Arg Gly Ser Gln | 285 |
| Ile Gly Arg Cys Val Val Met Pro Cys Asn Cys Ser Lys Val His | 300 |
| Ala Ile Leu Asn Asn Arg Gly Met Glu Lys Asn Leu Ile Glu Glu | 315 |
| Phe Ser Ala Ile Glu | 320 |

<210> 20

<211> 963

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 20

| | |
|--|-----|
| ATGGCTTGCC AAAACAATCT CGTTGTGAAG CAAATCATGG ACTTATACAA CCAAATCTCA | 60 |
| AACCTCGAGA GCTTAAAACC ATCCAAGAAT GTCGACACTT TGTTTCAGACA ACTTGTGTCC | 120 |
| ACGTGCTTAC CAACGGACAC GAACATCGAT GTCACAGAGA TACACGATGA AAAAGTCAAA | 180 |
| GACATGAGAT CTCATCTCAT CAAGCTTTGT GGTGAAGCCG AAGGTTATTT AGAGCAACAC | 240 |
| TTTTCAGCAA TCTTAGGCTC TTTTGAAGAC AACCTCTAA ACCATTTACA CATCTTCCCC | 300 |



| | |
|--|-----|
| TATTACAACA ACTATCTCAA ACTAGGCAAA CTCGAATTCG ATCTCCTTTC TCAGCACACA | 360 |
| ACCCATGTCC CGACCAAAGT CGCCTTTATT GGTTCGGTC CGATGCCACT TACTTCCATC | 420 |
| GTCTTGGCCA AGTTCCACCT CCCCAACACA ACGTTCCACA ACTTCGACAT CGACTCACAC | 480 |
| GCCAACACAC TCGCTTCAAA CCTCGTTTCT CGTGATTCTG ACCTTTCCAA ACGCATGATT | 540 |
| TTCCACACAA CTGATGTATT AAACGCTAAG GAGGGGTTAG ACCAATACGA TGTGTGTTTTC | 600 |
| TTGGCAGCTC TTGTTGGGAT GGATAAAGAG TCAAAGGTCA AAGCTATTGA GCATTTAGAG | 660 |
| AAGCATATGG CCCCTGGAGC TGTGGTGATG CTAAGAAGTG CTCATGGTCT TAGAGCTTTC | 720 |
| TTGTATCCAA TCGTTGACTC TTGTGATCTT AAAGGGTTTG AGGTGTAAAC CATTTATCAT | 780 |
| CCGTCTGACG ACGTGGTTAA TTCGGTGGTC ATCGCACGTA AGCTTGGTGG TTCAAATGGA | 840 |
| GCTCGAGGCA GCCAGATCGG ACGGTGTGTG GTTATGCCTT GTAATTGCTC TAAGGTCCAC | 900 |
| GCGATCTTGA ACAATCGTGG TATGGAGAAG AATTTGATCG AGGAGTTTAG TGCCATCGAG | 960 |
| TAA | 963 |

<210> 21

<211> 320

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 21

| | |
|---|-----|
| Met Gly Cys Gln Asp Glu Gln Leu Val Gln Thr Ile Cys Asp Leu | 15 |
| Tyr Glu Lys Ile Ser Lys Leu Glu Ser Leu Lys Pro Ser Glu Asp | 30 |
| Val Asn Ile Leu Phe Lys Gln Leu Val Ser Thr Cys Ile Pro Pro | 45 |
| Asn Pro Asn Ile Asp Val Thr Lys Met Cys Asp Arg Val Gln Glu | 60 |
| Ile Arg Leu Asn Leu Ile Lys Ile Cys Gly Leu Ala Glu Gly His | 75 |
| Leu Glu Asn His Phe Ser Ser Ile Leu Thr Ser Tyr Gln Asp Asn | 90 |
| Pro Leu His His Leu Asn Ile Phe Pro Tyr Tyr Asn Asn Tyr Leu | 105 |
| Lys Leu Gly Lys Leu Glu Phe Asp Leu Leu Glu Gln Asn Leu Asn | 120 |
| Gly Phe Val Pro Lys Ser Val Ala Phe Ile Gly Ser Gly Pro Leu | 135 |
| Pro Leu Thr Ser Ile Val Leu Ala Ser Phe His Leu Lys Asp Thr | 150 |



| | |
|---|-----|
| Ile Phe His Asn Phe Asp Ile Asp Pro Ser Ala Asn Ser Leu Ala | 165 |
| Ser Leu Leu Val Ser Ser Asp Pro Asp Ile Ser Gln Arg Met Phe | 180 |
| Phe His Thr Val Asp Ile Met Asp Val Thr Glu Ser Leu Lys Ser | 195 |
| Phe Asp Val Val Phe Leu Ala Ala Leu Val Gly Met Asn Lys Glu | 210 |
| Glu Lys Val Lys Val Ile Glu His Leu Gln Lys His Met Ala Pro | 225 |
| Gly Ala Val Leu Met Leu Arg Ser Ala His Gly Pro Arg Ala Phe | 240 |
| Leu Tyr Pro Ile Val Glu Pro Cys Asp Leu Gln Gly Phe Glu Val | 255 |
| Leu Ser Ile Tyr His Pro Thr Asp Asp Val Ile Asn Ser Val Val | 270 |
| Ile Ser Lys Lys His Pro Val Val Ser Ile Gly Asn Val Gly Gly | 285 |
| Pro Asn Ser Cys Leu Leu Lys Pro Cys Asn Cys Ser Lys Thr His | 300 |
| Ala Lys Met Asn Lys Asn Met Met Ile Glu Glu Phe Gly Ala Arg | 315 |
| Glu Glu Gln Leu Ser | 320 |

<210> 22

<211> 963

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 22

| | |
|--|-----|
| ATGGGTTGCC AAGACGAACA ATTGGTGCAA ACAATATGCG ATCTCTACGA AAAGATCTCA | 60 |
| AAGCTTGAGA GTCTAAAACC ATCCGAAGAT GTCAACATTC TCTTCAAGCA GCTCGTTTCC | 120 |
| ACATGCATAC CACCAAACCC TAACATCGAT GTCACCAAGA TGTGTGACAG AGTCCAAGAG | 180 |
| ATTGCACTTA ATCTCATCAA GATTTGTGGT CTAGCCGAAG GTCACCTAGA AAACCATTTC | 240 |
| TCTTCGATCT TGACCTCTTA CCAAGACAAC CCACTTCATC ATTTAAACAT TTTCCCTTAT | 300 |
| TACAACAACCT ATTTGAAACT CGGAAAGCTC GAGTTCGACC TCCTCGAACA AAACCTAAAT | 360 |
| GGCTTTGTCC CAAAGAGTGT GGCTTTCATT GGATCTGGTC CTCTTCCTCT CACTTCCATC | 420 |
| GTTCTTGCTT CATTCCATCT CAAAGACACA ATCTTTCACA ACTTTGACAT CGACCCATCA | 480 |
| GCGAACTCAC TCGCTTCTCT TCTGGTTTCC TCTGATCCAG ACATCTCTCA ACGCATGTTC | 540 |
| TTCCACACCG TTGATATAAT GGACGTGACA GAGAGCTTAA AGAGCTTTGA TGTCGTGTTT | 600 |



| | |
|---|-----|
| CTAGCTGCTC TTGTTGGAAT GAACAAAGAG GAGAAAGTTA AAGTGATCGA GCATCTGCAG | 660 |
| AAACACATGG CTCCTGGTGC TGTGCTCATG CTTAGGAGTG CTCATGGTCC GAGAGCGTTT | 720 |
| CTTTATCCGA TCGTTGAGCC GTGTGATCTT CAGGGGTTTC AGGTTTTGTC TATTTATCAC | 780 |
| CCAACAGATG ATGTTATCAA CTCCGTGGTG ATCTCTAAAA AGCATCCAGT TGTTCATT | 840 |
| GGGAATGTTG GTGGTCCTAA TTCATGCTTG CTCAAGCCTT GCAACTGTTC CAAGACCCAC | 900 |
| GCGAAAATGA ACAAGAACAT GATGATCGAG GAGTTCGGAG CTAGGGAGGA ACAGTTGTCT | 960 |
| TAA | 963 |



11
12
13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02305

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N9/00, 15/52, C12P13/04, C07K16/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N9/00-9/94, 15/52-15/61, C12P13/04, C07K16/40

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DBJ/GenSeq, BIOSIS, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|----------------------------|
| X A | Plant and Soil, Volume 165, Number 2, issued 1994, Kyoko Higuchi et al., "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots", pages 173-179 | 1-3, 22-24 4-21, 25, 26 |
| P, X | Plant Physiology, Volume 119, Number 2, issued February 1999, Kyoko Higuchi et al., "Cloning of Nicotianamine Synthase Genes, Novel Genes Involved in the Biosynthesis of Phytosiderophores", pages 471-479 | 1-26 |
| P, X | Database GenBank, Accession No.AB019525, February 11, 1999, Mori, S. and Higuchi, K., "Hordeum vulgare hvnas7 mRNA for nicotianamine synthase 7, complete cds." | 1-3, 8-10, 12-24 |
| P, X | Database GenBank, Accession No.AB021746, March 30, 1999, Mori, S., "Oryza sativa osnas1 mRNA for nicotianamine synthase 1, complete cds." | 1, 6-9, 12-24 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
3 August, 1999 (03. 08. 99)Date of mailing of the international search report
10 August, 1999 (10. 08. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/02305

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P, X | Database GenBank, Accession No.AB021934, February 11, 1999, Suzuki, K. and Mori, S., "Arabidopsis thaliana gene for nicotianamine synthase, complete cds." | 1, 4, 5, 8, 11-24 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N9/00, 15/52, C12P13/04, C07K16/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N9/00-9/94, 15/52-15/61, C12P13/04, C07K16/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS, WPI

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|----------------------------|
| X A | Plant and Soil, Volume 165, Number 2, issued 1994, Kyoko Higuchi et al., "Purification and characterization of nico- tiamine synthase from Fe-deficient barley roots", pages 173-179 | 1-3, 22-24 4-21, 25, 26 |
| P, X | Plant Physiology, Volume 119, Number 2, issued February 1999, Kyoko Higuchi et al., "Cloning of Nicotianamine Syn- thase Genes, Novel Genes Involved in the Biosynthesis of Phytosiderophores", pages 471-479 | 1-26 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.99

国際調査報告の発送日

10.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|----------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB019525, February 11, 1999, Mori, S. and Higuchi, K., "Hordeum vulgare hvnas7 mRNA for nicotianamine synthase 7, complete cds." | 1-3, 8-10, 12-24 |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB021746, March 30, 1999, Mori, S., "Oryza sativa osnas1 mRNA for nicotianamine syn- thase 1, complete cds." | 1, 6-9, 12-24 |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB021934, February 11, 1999, Suzuki, K. and Mori, S., "Arabidopsis thaliana gene for nico- tianamine synthase, complete cds." | 1, 4, 5, 8, 11-24 |

57
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|--|
| Applicant's or agent's file reference JA908462 | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/JP99/02305 | International filing date (day/month/year) 30 April 1999 (30.04.99) | Priority date (day/month/year) 30 April 1998 (30.04.98) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 9/00, 15/52, C12P 13/04, C07K 16/40 | | |
| Applicant JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION | | |

| |
|---|
| <p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p> |
| <p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p> |

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 20 October 1999 (20.10.99) | Date of completion of this report 12 May 2000 (12.05.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/JP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02305

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/02305

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

| | | | |
|-------------------------------|--------|------|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-26 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-26 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-26 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations**Claims 1, 2**

Document 1 [Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots, (Kyoko Higuchi et al.), Plant and Soil, 1994, Vol. 165, No. 2, pages 173-179] cited in the ISR discloses barley-derived nicotianamine synthase (NAS) which is purified to the extent that it forms only 1 band with SDS-PAGE. Nevertheless, it is not purified to the extent that it can be recognized as being a single chemical substance, but rather is merely a mixture of various NASs (see for example [Soil Sci. Plant Nutr., 1999, Vol. 45, No. 3, pages 681-691]. It is thus considered that the subject matter of claims 1 and 2, which aims for the protection given by a single chemical substance, is neither disclosed in document 1 or any of the documents cited in the ISR, nor obvious to a specialist in the technical field in question based on prior art (which includes said documents).

Claims 3-26

The subject matter of claims 3-26 is neither disclosed in any of the documents cited in the ISR, nor considered to be obvious to a specialist in the technical field in question based on prior art (which includes said documents).



特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）



出願人代理人

佐 伯 憲 生

殿

あて名

〒 103-0027

東京都中央区日本橋三丁目15番2号
高愛ビル 9階

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

(法施行規則第57条)
〔PCT規則71.1〕

発送日
(日.月.年)

22.05.00

重要な通知

出願人又は代理人
の書類記号

JA908462

国際出願番号

PCT/JP99/02305

国際出願日

(日.月.年) 30.04.99

優先日

(日.月.年) 30.04.98

出願人 (氏名又は名称)

科学技術振興事業団

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。
2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。
3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。
4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4N 8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）



注 意

1. 文献の写しの請求について

国際予備審査報告に記載された文献であって国際調査報告に記載されていない文献の複写

特許庁にこれらの引用文献の写しを請求することができますが、日本特許情報機構でもこれらの引用文献の複写物を販売しています。日本特許情報機構に引用文献の複写物を請求する場合は下記の点に注意してください。

〔申込方法〕

(1) 特許（実用新案・意匠）公報については、下記の点を明記してください。

○特許・実用新案及び意匠の種類

○出願公告又は出願公開の年次及び番号（又は特許番号、登録番号）

○必要部数

(2) 公報以外の文献の場合は、下記の点に注意してください。

○国際予備審査報告の写しを添付してください（返却します）。

〔申込み及び照会先〕

〒100 東京都千代田区霞が関3-4-2 商工会館・弁理士会館ビル

財団法人 日本特許情報機構 サービス課

TEL 03-3503-3900

注) 特許庁に対して文献の写しの請求をすることができる期間は、国際出願日から7年です。

- ### 2. 各選択官庁に対し、国際出願の写し（既に国際事務局から送達されている場合は除く）及びその所定の翻訳文を提出し、国内手数料を支払うことが必要となります。その期限については各国ごとに異なりますので注意してください。（条約第22条、第39条及び第64条(2)(a)(i)参照）



特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

[PCT36条及びPCT規則70]

| | | | |
|---|---|----------------------------|--|
| 出願人又は代理人 の書類記号 JA908462 | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | | |
| 国際出願番号 PCT/JP99/02305 | 国際出願日 (日.月.年) 30.04.99 | 優先日 (日.月.年) 30.04.98 | |
| 国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12N9/00, 15/52, C12P13/04, C07K16/40 | | | |
| 出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団 | | | |

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。

(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

| | | | |
|---|----------------------------|---------|------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 20.10.99 | 国際予備審査報告を作成した日 12.05.00 | | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 内 田 俊 生 | 4N | 8214 |
| 電話番号 03-3581-1101 | | 内線 3488 | |

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

| | | | |
|---------------|-------|--------|---|
| 新規性(N) | 請求の範囲 | 1 - 26 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |
| 進歩性(IS) | 請求の範囲 | 1 - 26 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |
| 産業上の利用可能性(IA) | 請求の範囲 | 1 - 26 | 有 |
| | 請求の範囲 | | 無 |

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1, 2

国際調査報告で引用された文献1・(Plant and Soil, Volume 165, Number 2, issued 1994, Kyoko Higuchi et al., "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots", pages 173-179) には、SDS-PAGEで1バンドになる程度に精製されたオオムギ由来のニコチアミン合成酵素(NAS)が記載されている。しかしながら、これは単一の化学物質と認識できる程度に精製されたものではなく、各種NASの混合物にすぎないから(例えば、Soil Sci. Plant Nutr., Volume 45, Number 3, issued 1999, pages 681-691 参照)、単一の化学物質についての保護を求めている請求の範囲1, 2の発明は、文献1を初めとする国際調査報告で引用されたいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当該技術分野の専門家にとってそれらの文献を含む先行技術からみて自明のものでもない。

請求の範囲3-26

請求の範囲3-26の発明は、国際調査報告で引用されたいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当該技術分野の専門家にとってそれらの文献を含む先行技術からみて自明のものでもない。



P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 26 MAY 2000

WIPO PCT

| | | |
|---|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 JA908462 | 今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP99/02305 | 国際出願日 (日.月.年) 30.04.99 | 優先日 (日.月.年) 30.04.98 |
| 国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12N9/00, 15/52, C12P13/04, C07K16/40 | | |
| 出願人(氏名又は名称) 科学技術振興事業団 | | |

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

| | | |
|---|---|---------|
| 国際予備審査の請求書を受理した日 20.10.99 | 国際予備審査報告を作成した日 12.05.00 | |
| 名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官(権限のある職員) 内 田 俊 生 電話番号 03-3581-1101 内線 3488 | 4N 8214 |

様式PCT/IPEA/409(表紙)(1998年7月)



I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲

1 - 26

有

請求の範囲

無

進歩性(IS)

請求の範囲

1 - 26

有

請求の範囲

無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲

1 - 26

有

請求の範囲

無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1, 2

国際調査報告で引用された文献1 (Plant and Soil, Volume 165, Number 2, issued 1994, Kyoko Higuchi et al., "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots", pages 173-179) には、SDS-PAGEで1バンドになる程度に精製されたオオムギ由来のニコチアミン合成酵素(NAS)が記載されている。しかしながら、これは単一の化学物質と認識できる程度に精製されたものではなく、各種NASの混合物にすぎないから(例えば、Soil Sci. Plant Nutr., Volume 45, Number 3, issued 1999, pages 681-691 参照)、単一の化学物質についての保護を求めている請求の範囲1, 2の発明は、文献1を初めとする国際調査報告で引用されたいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当該技術分野の専門家にとってそれらの文献を含む先行技術からみて自明のものでもない。

請求の範囲3-26

請求の範囲3-26の発明は、国際調査報告で引用されたいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当該技術分野の専門家にとってそれらの文献を含む先行技術からみて自明のものでもない。



PCT

EP

US

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
〔PCT 18条、PCT規則43、44〕

| | | |
|--------------------------------------|---|-------------------------|
| 出願人又は代理人 の書類記号 JA908462 | 今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。 | |
| 国際出願番号 PCT/JP99/02305 | 国際出願日 (日.月.年) 30.04.99 | 優先日 (日.月.年) 30.04.98 |
| 出願人(氏名又は名称) 科 学 技 術 振 興 事 業 団 | | |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT 18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N9/00, 15/52, C12P13/04, C07K16/40

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N9/00-9/94, 15/52-15/61, C12P13/04, C07K16/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS, WPI

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|----------------------------|
| X A | Plant and Soil, Volume 165, Number 2, issued 1994, Kyoko Higuchi et al., "Purification and characterization of nicotianamine synthase from Fe-deficient barley roots", pages 173-179 | 1-3, 22-24 4-21, 25, 26 |
| P, X | Plant Physiology, Volume 119, Number 2, issued February 1999, Kyoko Higuchi et al., "Cloning of Nicotianamine Synthase Genes, Novel Genes Involved in the Biosynthesis of Phytosiderophores", pages 471-479 | 1-26 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.99

国際調査報告の発送日

10.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生



4N

8214

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|----------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB019525, February 11, 1999, Mori, S. and Higuchi, K., "Hordeum vulgare hvnas7 mRNA for nicotianamine synthase 7, complete cds." | 1-3, 8-10, 12-24 |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB021746, March 30, 1999, Mori, S., "Oryza sativa osnas1 mRNA for nicotianamine synthase 1, complete cds." | 1, 6-9, 12-24 |
| P, X | Database GenBank, Accession No. AB021934, February 11, 1999, Suzuki, K. and Mori, S., "Arabidopsis thaliana gene for nicotianamine synthase, complete cds." | 1, 4, 5, 8, 11-24 |

